Temporäre, partielle Ischämie als Proliferationsreiz für das Leberparenchym

Rolf-Dieter Grözinger

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0089

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
(Direktor: Professor Dr. Max EDER)

Temporäre, partielle Ischämie als Proliferationsreiz für das Leberparenchym

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Rolf-Dieter GRÖZINGER
aus Heilbronn

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Referent:	Professor Dr. H. RABES
Korreferent:	Professor Dr. M. EDER
Dekan:	Professor Dr. W. SPANN
Tag der mündlichen Prüfung:	14. 12. 1971

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Untersuchungsgut und Methoden	3
	1. Tiermaterial	3
	2. Operationsmethoden	3
	a) Operatives Vorgehen	
	Allgemeines 1/3-Ligatur 2/3-Ligatur Kontrolltiere	
	b) Spezielle Versuchsanordnung	
	Ligaturdauer Versuchsdauer	
	3. Radioaktives Material	5
	4. Entnahme und Präparation der Organe	6
	a) Sektion der Labortiere	
	b) Verbrennungsproben	
	5. Histoautoradiographie	7
	a) Herstellung der histologischen Schnitte	
	b) Auswertung der histologischen Präparate	
	6) Flüssigkeitsszintillationsmessung	8
	a) Verbrennung	
	b) Nulleffekt	
	c) Eichkurve	
	d) Aktivitätsmessung ^{3}H-markierter Gewebe	
	7) Histochemische Untersuchungen	10
III.	Ergebnisse	12
	Versuch A: Proliferation der Hepatocyten nach einer 33 % des Leberparenchyms umfassenden Ischämie.	12
	1) Messung der Inkorporation von ^{3}H-Thymidin in die Leber nach partieller Ischämie von 1/3 des Parenchyms.	12
	2) Autoradiographie	14

Seite

Versuch B: Proliferation der Hepatocyten nach einer 67 % des Leberparenchyms umfassenden Ischämie. 15

1) Messung der Inkorporation von ^{3}H-Thymidin in die Leber nach partieller Ischämie von 2/3 des Parenchyms. 16

2) Autoradiographie. 17

Versuch C: Histochemische Untersuchungen nach einer 67 % des Lebenparenchyms umfassenden Ischämie. 28

1) Adenosintriphosphatase 28

2) Glucose-6-Phosphatase 32

3) Succinodehydrogenase 35

IV. Erörterungen 38

V. Zusammenfassung 50

VI. Literaturverzeichnis 52

VII. Lebenslauf 61

I. Einleitung

Um die Natur des normalen, regenerativen und malignen Wachstums zu erfassen, muß man sich bei den Untersuchungen vorerst auf Modellfälle beschränken. Als ein solches Modell bietet sich die Leber an.

Schon 1885 beobachtete von Podwyssozki die mitotische Regeneration der Leber nach Verletzung des Leberparenchyms. Ponfick wies 1889, 1890 und 1895 nach Teilhepatektomie am Kaninchen, die bis zu 90 % des Leberparenchyms umfaßte, eine Wiederherstellung des ursprünglichen Organgewichtes nach. Diese Regenerationsfähigkeit der Leber hat es ermöglicht, an diesem Organ den zeitlichen Ablauf der DNS-Synthese, der Mitosetätigkeit und die histologisch und biochemisch nachweisbaren Frühveränderungen in regenerierendem Gewebe exakt zu erfassen.

Die Frage nach Steuerung der Zellproliferation wie etwa bei jugendlichem Gewebe und regenerativem Wachstum, ist trotz ausgedehnter Untersuchungen noch immer ungelöst: Wie geschieht es, daß mit der Adoleszens die Zellteilungsrate in bestimmten Geweben abnimmt? Wie werden die Zellen ruhender Organe informiert, die präsynthetische G_1-Phase schneller zu durchlaufen oder in dieses Stadium überhaupt erst einzutreten?

Für Untersuchungen zur Steuerung der Zellproliferation erscheint die Leber besonders geeignet aufgrund ihrer einheitlichen parenchymatösen Struktur mit wenigen Zelltypen. Sie gehört wie die Niere zum Typ der stabilen Gewebe (Einteilung nach Bizzozero 1894), welche im erwachsenen Organismus nur unter besonderen Bedingungen proliferieren.

Bei Untersuchungen der Eigenart der Proliferationsmechanismen wurden insbesondere Lebergifte, Dauerischämie und Teilhepatektomie zur Setzung eines Proliferationsreizes angewendet. Am häufigsten wurden als Stimulus zur Proliferation zwei Drittel

der Leber durch Resektion entfernt. Die Teilischämie der Leber wurde fast ausschließlich in Form einer Dauerischämie oder einer Unterbindung einzelner Strukturen des Leberhilus (Cameron und Oakley 1932, Steiner und Martinez 1961), wie z.T. von Ästen der Vena portae durchgeführt (Rous and Larimore 1920, Weinbren and Ghorpade 1955, Lieberman and Short 1965).

Die Ergebnisse vergleichbarer Experimente sind häufig widersprüchlich und haben zur Lösung der Problematik nur wenig beitragen können. Die erforschten biochemischen Frühveränderungen nach einem proliferationsförderndem Eingriff sind meist den Beweis für ihre spezifische Wirkung schuldig geblieben (Tsukada und Lieberman 1964a, b, 1965; Lieberman und Short 1965; Lieberman, Gingold, Kane und Short 1965; Lieberman, Kaneund Short 1965; Siebert 1966).

Es erhebt sich die Frage, ob hemmende oder fördernde Faktoren bzw. beide das Regenerationsgeschehen kontrollieren. Es ist unbekannt, ob solche hypothetischen Substrate stets im Organismus vorhanden sind oder erst bei Bedarf synthetisiert oder aktiviert werden. Die Existenz humoraler Komponenten scheint sich zu bestätigen. In der vorliegenden Arbeit wird die Proliferationsaktivität der Hepatocyten in Abhängigkeit von Ausmaß und Dauer der Ischämie in verschiedenen Zeiträumen nach der Operation untersucht.

II. Untersuchungsgut und Methoden

1. Tiermaterial:

Es wurden ausschließlich männliche Albinoratten (Wistar AF/Han) verwendet, die bei einer Raumtemperatur von 22°C in Makrolonkäfigen gehalten wurden. Sie erhielten vor und nach der Operation Wasser und Standardfutter (Altromin^{R}) ad libitum und wurden bei einem Körpergewicht von 145 - 160 g operiert. Diese Gewichtsklasse entspricht einem Lebensalter von 6 - 7 Wochen. Tiere mit anatomisch variierten Leberlappen fanden keine Verwendung.

2. Operationsmethoden:

a) Operatives Vorgehen

Allgemeines: Die Operationen wurden unter Berücksichtigung aseptischer Kautelen durchgeführt. Die Tagesrhythmik wurde beachtet, indem die Tiere so operiert wurden, daß die Tötungen immer zur selben Tageszeit, im Versuch A zwischen 11.3o h und 14.oo h und im Versuch B zwischen 11.oo h und 13.oo h erfolgten.

Sämtliche Ratten wurden in Äthernarkose und Rückenlage durch medianen Hautschnitt mit peritonealer Öffnung bis über den Prozessus xyphoideus entlang der Linea alba laparotomiert. Die Assistenz hielt die Bauchdecken auseinander und überwachte die Narkose, während ein Ast des Hilus mit Arteria hepatica, Vena portae und Ductus choledochus ligiert wurden. Nach Unterbrechung der Blutzufuhr zeigte eine livide Verfärbung die Ischämie des ligierten Lappens an. Nach Öffnung der Ligatur wurde die Wunde mit einer fortlaufenden Naht in zwei Schichten verschlossen.

1/3-Ligatur: Die 1/3-Ligatur betraf den sinistrolateralen Lappen, im folgenden mit A bezeichnet. Sein Anteil am Gesamtleberparenchym beträgt etwa 30 Feuchtgewichtsprozent. Die Ligatur wurde mit einer Arterienklemme durchgeführt, deren Zähnelung glattgefeilt und deren Branchen mit kurzen, kleinen Silikonschläuchen überzogen

waren. Während der Mittellappen, im folgenden mit B bezeichnet, nach oben geklappt wurde und durch Adhäsion am Zwerchfell fixiert blieb, wurde die Klemme von ventral her senkrecht an den Hilus angeführt, durch Einrasten geschlossen und mit Gummiringen am Querstab eines Statives elastisch befestigt. Während des Zustandes der Ischämie wurden die Bauchdecken unter Dauernarkose vorübergehend mit Michelklammern in zwei Schichten verschlossen.

2/3-Ligatur: Der eine der beiden Portaäste verzweigt sich in den sinistrolateralen Lappen A und den ventralen Lappen B und versorgt damit 67 - 68 % des Leberparenchyms (Higgins und Anderson 1931, Griffith und Farris 1942, Bucher und Glinos 1950). Hier erschien es günstig, diese beiden Leberlappen gemeinsam abzubinden, um eventuelle Kollateralgefäße mitzuerfassen und die ungehinderte Durchblutung der Restleber zu gewährleisten.

Diesmal wurde statt der Arterienklemme eine Gummibandage verwendet, damit der nun umfangreichere Leberhilus besser erfaßt werden konnte. Mit Hilfe zweier anatomischer Pinzetten wurde sie um die beiden Leberhili der Lappen A und B geschlungen und nach Überprüfung auf richtigen Sitz über dem Gefäßstrang vorsichtig verknotet. Nach entsprechender Ischämiedauer wurde die Verknotung durchschnitten und die Gummiteilchen entfernt. Bei dieser Gelegenheit konnte die Suffizienz der Abbindung festgestellt werden. Falls sich ein Knoten gelöst hatte, wurde das betreffende Tier nicht ausgewertet. Mit dieser Technik konnte die Ligatur schnell und rechtzeitig gelöst werden.

Während der 2/3-Ischämie (Versuch B) konnten die Tiere in den Käfig zurückgesetzt werden, nachdem die Bauchdecken mit Michelklammern verschlossen und die Narkose abgesetzt worden war. Die wenigen Zwischenfälle bestanden aus Perforation des Zwerchfells, Verletzung der Vena cava caudalis oder Ätherschock. Diese Tiere und die Tiere mit anatomischen Anomalien der Leberlappen wurden nicht ausgewertet. Bei komplikationslos verlaufener Operation erwachten die Versuchstiere schnell aus der Narkose.

Kontrolltiere: Die Kontrolltiere für Versuch A und B wurden laparotomiert und die Leber luxiert. Erst nach den entsprechenden Zeiträumen wie bei der Ischämie wurden die Bauchdecken wieder verschlossen, um den Operationsstreß zu simulieren.

b) Spezielle Versuchsanordnung

Ligaturdauer: Die Abklemmung des Leberhilus dauerte bei den Versuchsgruppen A, B und C jeweils 15, 30, 60 und 120 Minuten.

Versuchsdauer: Bei der Darstellung der Experimente werden drei Versuchsgruppen (A, B, C) mit und ohne postischämische Manifestationszeit unterschieden. Die Manifestationszeit erstreckte sich bei 1/3-Ischämie (Versuch A) von Ligaturbeginn bis zum Zeitpunkt der Thymidininjektion und dauerte 14, 24 bzw. 36 Stunden. Bei der 2/3-Ischämie (Versuch B) dauerte sie 12, 24, 36 bzw. 48 Stunden, wurde jedoch vom Ende der Ligatur an berechnet. Die anschließende Expositionszeit (radioaktive Versuchszeit) von einer Stunde zwischen Thymidininjektion und Tötung wurde genau eingehalten. Die Tiere der Versuchsgruppe C wurden sofort nach Beendigung der Ischämie getötet und seziert, um Kryostatschnitte der Leberlappen anzufertigen und die Enzymaktivität histochemisch darzustellen.

3. Radioaktives Material:

Zur radioaktiven Markierung der DNS wurde Thymidin-6-T(n) in wässriger Lösung (spezifische Aktivität 5000 mCi/mM, Radiochemical Centre Amersham) verwendet. Mit Salzlösung nach Hanks verdünnt, wurde das ^{3}H-Thymidin in einer Dosis von 200 µCi pro Tier in 1 ml 60 Minuten vor der Tötung i. p. verabreicht.

4. Entnahme und Präparation der Organe:

a) Sektion der Labortiere

60 Minuten nach Injektion des tritiierten Thymidins wurden die Ratten durch Luxation der Halswirbelsäule getötet. Ein breit angelegter Schnitt durch die Bauchdecken von caudal schräg nach beiden Seiten kranial gegen die Rippenbögen erlaubte einen ungehinderten Zugang in das Abdomen. Zunächst wurde die Vena cava caudalis zwischen Hepar und Diaphragma durchtrennt, so daß sich das Blut in der Leber nicht stauen konnte, dann wurden die restlichen Gefäße am Leberhilus und die Bänder durchtrennt und die Leber in toto herausgenommen. Für Autoradiographie und Verbrennung wurden 1. der sinistrolaterale Lappen A (temporär ligiert) und 2. der dextrolaterale Lappen C (nicht ligiert) verwendet. Der ventrale Lappen B war bei der 2/3-Ischämie ebenfalls ligiert, wurde jedoch verworfen.

b) Verbrennungsproben

Vor der Fixierung in 10 %-igem Formalin, das zum Austausch nicht inkorporierter ^{3}H-Thymidin 0,1 mg inaktives Thymidin pro ml enthielt (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz), wurden aus dem freien Rande der Leberlappen mit der Sektionsschere kleine Gewebsteilchen herausgeschnitten. Von beiden Lappen wurden je zwei Proben, pro Tier also 4 Leberstücke gewonnen. Für diese Gewebsproben waren Tablette mit metallenen Kronkorkendeckeln, ausgelegt mit ca. 1 x 1 cm Filterpapier (Fa. Carl Schleicher & Schüll, Marke Selekta No 589^{2} Weißband Ø 11 cm, Pond. cineris unius 7^{-5}g), vorbereitet worden. Vor der Bestückung dieser Schälchen mit Leberproben wurden sie im Brutofen ca. 2 Stunden auf 70° C erhitzt. Die Wiegung mit einer Mikrowaage (Mettler Type B5) erfolgte dann mindestens 30 Minuten nach Abkühlung und Wiederaufnahme der Luftfeuchtigkeit in das Filterpapier. Die Metalldeckel waren auf der Unterseite durchnummeriert. Die Leberstückchen konnten jetzt aufgebracht werden. Vor der Trockengewichtsbestimmung (zweite Wiegung)

mußte eine nochmalige Erhitzung bei 70° C bis zur Gewichtskonstanz erfolgen, wobei wiederum Abkühlung und Aufnahme der Luftfeuchtigkeit abgewartet wurden.

5. Histoautoradiographie

a) Herstellung der histologischen Schnitte

Für die histoautoradiographischen Untersuchungen wurden 4 µ dicke Paraffinschnitte hergestellt, entparaffiniert, mit flüssiger Emulsion K_2 oder G_5 von Ilford überschichtet und für 14 - 21 Tage im Kühlschrank bei 4° C exponiert, wobei der optimale Entwicklungstermin anhand von Probeentwicklungen ermittelt wurde. Nach Entwicklung und Fixierung (Amidol, Na_2SO_3, KBr, $Na_2S_2O_3$, $K_2S_2O_5$ bei pH 4 und 21° C) wurden die Schnitte durch die Emulsion hindurch mit Hämalaun gefärbt.

b) Auswertung der histologischen Präparate

Der Markierungsindex ergab sich durch Ermittlung des Prozentsatzes der markierten Zellen. Mit Hilfe der Gesichtsfeldbestimmung wurden 10^4 Parenchymzellen in meanderförmiger Zählweise durchgemustert. In 30 Gesichtsfeldern wurde jeweils die durchschnittliche Zellzahl bestimmt, um daraus auf die erforderliche Anzahl der Gesichtsfelder zu schließen.

Zur Auszählung der autoradiographischen Präparate wurden ein binokulares Mikroskop (Okular 10 X GF, Objektiv 90 X, Ölimmersion) und handbediente Zählgeräte zur Registrierung der Zellzahl insgesamt, der markierten Zellen und der Gesichtsfelder benutzt. Es wurden nach histologischen Gesichtspunkten nur Leberparenchymzellen berücksichtigt und nur diejenigen Zellkerne als markiert angesehen, die im Vergleich zum "Background" in flächengleichen Bezirken mindestens die dreifache Anzahl von Silberkörnern aufwiesen.

6. Flüssigkeitsszintillationsmessung:

Die Methode ist eine Ergänzung zur Histoautoradiographie. Die Proben hierfür und die histologischen Schnitte stammen jeweils aus den Organen derselben Versuchstiere.

a) Verbrennung ^{3}H-markierten, biologischen Materials.

Die besondere Präparationsmethode der radioaktiven Organstückchen stammt ursprünglich von Schöninger (1955) und wurde speziell für die ^{3}H- und ^{14}C-Messung später von Kalberer und Rutschmann (1961) modifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde weitgehend nach der von Rabes (1967) angegebenen Methode vorgegangen.

Die Aufbereitung des zu messenden Materials erfolgt durch Verbrennung der Organstückchen in Sauerstoffatmosphäre in einem geschlossenen Glaskolben. Von den Verbrennungsprodukten (Kohlendioxyd und Wasser) vermischt sich das mit Tritium markierte Wasser nach Kondensation und Umschwenken des Kolbens quantitativ in der vorgekühlten Methanolvorlage von 10 ml. 5 ml dieses Gemisches wurden entnommen und mit 15 ml Szintillatorflüssigkeit (Bray 1960) versetzt. Im Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Tricarb Modell 3214) wurde die Aktivität dieser Proben ermittelt.

Der Verbrennungskolben (Volumen 1 Liter) besteht aus Duranglas. In seinem Schliffstopfen sind zwei Platinelektroden eingeschmolzen und nach außen durchgeführt. Am unteren Teil trägt der Kolben einen 2 cm dicken Ansatzstutzen von 9 cm Länge. Die eine Platinelektrode ist mit einem Körbchen für die Verbrennungsproben ausgestattet, auf welches bei der Zündung (mit Hochfrequenz-Vacuum-Prüfgerät der Fa. Leibold VP 23, nach dem Prinzip der Tesla-Ströme) von der zweiten, benachbarten Elektrode ein Funken überspringt. Der untere Ansatzstutzen wurde mit 10 ml Methanol pro analysi gefüllt und im CO_2-Aceton-Kältebad ausreichend vorgekühlt (Kalberer und Rutschmann 1961), um den Dampfdruck des

Methanols niedrig zu halten. Durch die obere Öffnung wurde der zur Verbrennung notwendige Sauerstoff im Überschuß eingeleitet, bevor das System mit dem Schliffstopfen verschlossen wurde. Die eingebrachte Gewebsprobe war mit einem ca. 1 x 1 cm großen aschefreien Filterpapier (Fa. C. Schleicher & Schüll, Marke Selekta No 589^2 Weißband Ø 11 cm, Pond. cineris unius filt. 7^{-5}g) umwickelt. Zwischen den beiden Elektroden wurde das eine Papierende eingeklemmt, mit einem Tropfen Methanol benetzt und mit dem Gerät zur Erzeugung von Tesla-Strömen gezündet. Das Gewebsstückchen selbst war noch von einer Gelatinekapsel (Parke Davis No 5) eingeschlossen.

Vor jedem Verbrennungsvorgang war eine sorgfältige Reinigung des Kolbens und der verwendeten Pipetten notwendig. Dies geschah durch Waschung mit fließendem heißen Wasser über ca. 5 Minuten. Dann wurden der Kolben und die Pipetten mit absolutem Alkohol gespült und im Brutofen bis zur Trockenheit erhitzt.

b) Nulleffekt

Mit jeder Meßserie eines Teilversuches im Flüssigkeitsszintillationszähler wird zusammen mit den radioaktiven Gewebsproben und den Standardpräparaten (s.u.) unter denselben Bedingungen der Nulleffekt gemessen. Dazu wurden 3 Leerproben aus Gelatinekapseln und Filterpapier hergestellt und in derselben Weise wie die ^{3}H-Thymidin-haltigen Proben verbrannt.

c) Eichkurve (Baillie 1960, Rabes 1967)

Die vom Flüssigkeitsszintillationszähler erhaltenen Werte (Impulse pro Minute) müssen unter Berücksichtigung des Nullwertes und des Löscheffektes (Eichkurve) korrigiert werden, um über die Impulsausbeute (ca. 7 %) die tatsächliche Zerfallsrate zu bestimmen. Die Eichkurve für die ^{3}H-Flüssigkeitsszintillationsmessung wird erstellt auf der Grundlage der Messung von Präparaten bekannter Aktivität (Standardproben mit verschiedenem Lösch-

effekt) mit Hilfe zweier Meßkanäle mit unterschiedlicher Begrenzung des Impulshöhendiskriminators. Auf der Abszisse wird nach Abzug der Nullwerte der Quotient der Meßergebnisse (Kanal I : Kanal II) aufgetragen. Die registrierten Impulse pro Minute werden als Prozentsatz der Zahl der Zerfälle/Minute auf der Ordinate aufgetragen. Für jede Meßreihe wurde eine solche spezifische Eichkurve angefertigt.

d) Aktivitätsmessung ^{3}H-markierter Gewebe

Bei der Messung von Proben unbekannter Aktivität werden über die zu bestimmende Ausbeute (s.o.) die Zerfälle/Minute berechnet. Nach Division mit dem Organgewicht erhält man die Aktivität pro Gewichtseinheit (Zerfälle/min/mg) Gewebe.

7. Histochemische Untersuchungen

Es wurden insgesamt 8 Tiere operiert und untersucht, der Einzelversuch ist mit 2 Tieren belegt. Das Tiermaterial entsprach dem im Versuch A und B und ist, wie auch die Technik der 2/3-Ischämie, dort beschrieben.

Das Lebergewebe wurde nach Ablauf der Ischämiezeit entnommen und sofort in Kohlensäureschnee auf dem Gefriertisch eingefroren, um weitere biochemische Vorgänge in der Zelle und einen Enzymverlust zu verhindern. Untersucht wurden wiederum der unterbundene Lappen A und der nicht ligierte Lappen C. Die beiden Proben, die jeweils ca. 7 x 7 mm groß waren, wurden auf dem Gefriertisch des Mikrotoms dicht aneinander gelegt und eingefroren, so daß sie auf dem Objektträger nach der Färbung gleichzeitig im Lichtmikroskop nebeneinander betrachtet werden konnten.

Die histochemischen Reaktionen werden nach der Methode von Wachstein und Meisel (1957) zur Darstellung der Adenosintriphosphatase und Glukose-6-Phosphatase und nach Rosa und Tsou (1961) zum Nachweis der Succinodehydrogenase durchgeführt.

Zur Dokumentation wurden von den Gewebspräparaten Abbildungen angefertigt. Da sich die Präparate der ligierten und nicht ligierten Lappen jeweils vom gleichen Tier auf demselben Objektträger befanden, und damit die histochemischen Färbungen in beiden Geweben unter völlig gleichen Voraussetzungen verliefen, konnte man die unterschiedlichen Befunde gut objektivieren, zumal die dicht nebeneinanderliegenden Gewebe auch auf derselben Abbildung festgehalten werden konnten. Die Mikrophotos wurden hergestellt mit dem Lichtmikroskop Leitz, Ortholux mit Orthomat Typ OSK 1 bei 40- bzw. 100-facher Vergrößerung.

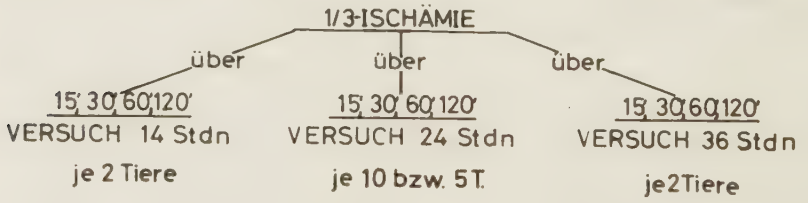
Mit der angewandten Methode konnte eine halb-quantitative Aussage über die Enzymaktivitäten gemacht werden. Dabei waren die Intensität der Tönung und das Verteilungsbild des Reaktionsproduktes für die Beurteilung maßgebend.

III. Ergebnisse

Die Gliederung der Hauptversuche in drei Untergruppen A, B und C wurde im methodischen Teil beschrieben. Die beiden Versuchsgruppen A und B werden in die Teilversuche a bis c bzw. a bis d, entsprechend dem Zeitraum zwischen Operation und Tötung unterteilt. Die autoradiographischen Ergebnisse und die der Flüssigkeitsszintillationsmessungen werden getrennt aufgeführt und verglichen.

Versuch A: Proliferation der Hepatocyten nach einer 33 % des Leberparenchyms umfassenden Ischämie.

Die Ischämie betraf in diesem Versuch 33 % des Lebergewebes. Zur temporären Abklemmung der entsprechenden Gebilde am Leberhilus, die den sinistrolateralen Leberlappen versorgen, wurde eine Arterienklemme benutzt.



1. Messung der Inkorporation von ^{3}H-Thymidin in die Leber nach partieller Ischämie von 1/3 des Parenchyms.

a) 14 Stunden nach Ligatur (Abb.1a)
Die Inkorporation von Thymidin in Abhängigkeit von der Ischämiedauer mit einer Manifestationszeit über 14 Stunden zeigt bis zu 60-minütiger Ischämiedauer kaum Veränderungen und weist für den ligierten Lappen A und für den Lappen C ohne Durchblutungssperre

ähnliche DNS-Synthese-Werte auf. Ein erhöhter Einbau von Thymidin wird erst nach 120 Minuten Ischämie deutlich. Zu diesem Zeitpunkt sprechen ligierter und nicht ligierter Lappen jedoch nur mäßig an. Die Thymidininkorporation ist im Lappen A auf das 1,89- und im Lappen C auf das 1,59-fache gegenüber den entsprechenden Werten bei 15 Minuten angestiegen. Es fällt auf, daß nur bei 30 Minuten Ischämie der ligierte Lappen schwächer inkorporiert als Lappen C.

b) 24 Stunden nach Ligatur (Abb.1b)

Der Zeitraum zwischen dem Eingriff und der radioaktiven Versuchszeit erstreckt sich über 24 Stunden; die Ergebnisse stammen bei der 15-, 30- und 60-minütigen Ischämiedauer von jeweils zehn und bei 120 Minuten von fünf Tieren.

Nach 24-stündiger Manifestationszeit zeigt sich eine deutliche lineare Beziehung zwischen Ischämiedauer und der gemessenen Radioaktivität: Im Lappen A nimmt sie um das 1,57- und im Lappen C um das 2,89-fache zwischen den 15- und 120-Minuten-Werten zu. Der Wert von Lappen A fällt von 60 Minuten an gegenüber demjenigen von C geringfügig ab. Vergleicht man jeweils den Durchschnitt der dicht zusammenliegenden A- und C-Werte mit den lediglich laparotomierten Kontrollen, so ergibt es eine Steigerung bei 30 Minuten Ischämiedauer um das 1,35-, bei 60 Minuten um das 1,35- und bei 120 Minuten um das 1,74-fache gegenüber den Kontrollwerten.

Offensichtlich genügt schon eine 15- bis 30-minütige Durchblutungssperre, um nach 24 Stunden eine Proliferationstätigkeit im ligierten und nicht ligierten Leberlappen hervorrufen zu können.

c) 36 Stunden nach Ligatur (Abb.1c)

Beide Lappen zeigen bei 15-minütiger Ischämie etwa gleiche Aktivität. Nach längerem Sauerstoffentzug im Lappen A überwiegt die Aktivität in diesem gegenüber Lappen C ganz deutlich. Gegenüber dem 15-Minuten-Wert betragen die Zuwachsraten im Lappen A bzw. C bei 30 Minuten Ischämiedauer das 1,55- bzw. das 1,20-fache, bei 60 Minuten das 2,30- bzw. das 1,36-fache und bei 120 Minuten das 2,80- bzw. im Lappen C jedoch nur das 1,24-fache.

Die statistisch gut gesicherten Ergebnisse unter b zeigen zwischen 15 und 120 Minuten Ischämiedauer einen deutlichen linearen Anstieg der Gesamtaktivität der beiden Lappen A und C. Andeutungsweise gilt dieser Befund auch für die Kurven bei a und c und findet auch bei der 2/3-Ischämie eine gewisse Bestätigung (Abb.2).

Bis 30 Minuten Ischämiedauer steigt die Regenerationskraft mit der Länge der Manifestationszeit offensichtlich nicht an. Eine 120-minütige Ischämie hat nach 36 Stunden nur im geschädigten Lappen einen geringen Aktivitätsanstieg, wo sich im histologischen Bild meist eine flächenhafte Nekrose mit subkapsulär intakt gebliebenem Restparenchym ausgebildet hat.

2. Autoradiographie

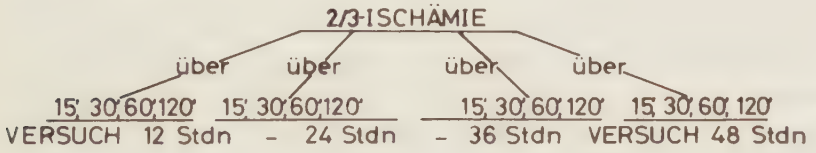
Während für das physiologische Ersatzwachstum bei erwachsenen Ratten ein ^{3}H-Markierungsindex von etwa 0,1 % angegeben wird, liegt der Markierungsindex in den Versuchen A Teil a bis c meist zwischen 0,00 und 0,88 %. Da die Aktivität der DNS-Synthese-Rate bei diesen noch nicht ganz erwachsenen Ratten physiologischerweise noch etwas größer ist, darf dieser teilweise erhöhte Markierungsindex nicht als Antwort auf den Proliferationsreiz gewertet werden.

Mit höheren Markierungsindizes 24 und 36 Stunden postoperativ bei 120 und gelegentlich auch bei 60 Minuten Ischämiedauer waren auch immer gleichzeitig manifeste Nekrosen im behandelten Leberparenchym zu beobachten. Die größere Aktivität betraf dabei außer den intakt gebliebenen Randsäumen der Nekrosen im Lappen A auch die Hepatocyten des intakten Lappen C.

Nach der Manifestation von 24 Stunden beantwortete der ligierte Lappen den Reiz in verringertem Maße. Nach 36 Stunden wies er eine höhere Markierung auf als der Kontrollappen C, wie auch aus der Verbrennungsmethode hervorgeht. Insgesamt gesehen ist nach Ischämie des Leberparenchyms keine wesentliche Regenerationstätigkeit zu erkennen. Lediglich mit dem Erscheinen von Nekrosen ist auch eine gewisse mäßige Proliferationsaktivität der Hepatocyten zu beobachten, so etwa in Lappen C 24 Stunden nach einer Ligaturdauer von 120 Minuten und im Lappen A 36 Stunden nach einer Durchblutungssperre von 60 Minuten.

Versuch B: Proliferation der Hepatocyten nach einer 67 % des Leberparenchyms umfassenden Ischämie

Gleichzeitige temporäre Unterbindung des medianen und sinistrolateralen Leberlappens, d.h. 2/3 des Leberparenchyms mit Hilfe einer Gummibandage.



je 2-3 T.

1. Messung der Inkorporation von ^{3}H-Thymidin in die Leber nach partieller Ischämie von 2/3 des Parenchyms.

In Abb. 2 ist die ^{3}H-Aktivität der Verbrennungsproben in Abhängigkeit von Ischämie- und Versuchsdauer dargestellt. Es kann eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Ischämiedauer und dem zunehmenden Regenerationseffekt sowohl im temporär ligierten als auch im nicht ligierten Gewebe gezeigt werden.

Die Stärke des Stimulationserfolges ist von der Größe der gesetzen Schädigung abhängig. Dies gilt sowohl für das Parenchym im ligierten Lappen A als auch für den nicht ligierten Lappen C. Nach einer Ligaturdauer von 15 Minuten sind zunächst Schwankungen der Thymidinaufnahme nach 12- und 48-stündiger Versuchsdauer nachweisbar (Abb. 2). Die Aufnahme in die Lappen A und Lappen C zeigt dabei jeweils die gleiche Größenordnung. Die Zerfallsraten der Teilversuche a bis d nehmen zwischen 30- und 60-minütiger Ischämiedauer einen steilen Verlauf nach oben und steigern sich gegenüber den Kontrollen annähernd linear (Tab. 2).

In den Abbildungen 6a bis d, die die Quotienten aus den radioaktiven Zerfällen/min/mg der Leberlappen A und Lappen C der einzelnen Zeitpunkte darstellt, wird ein linearer Abfall des Quotienten zwischen 15 und 120 Minuten bei 12-, 24- und 36-stündiger Versuchszeit deutlich, wobei lediglich der Wert für 60 Minuten ligierte Leber, die 36 Stunden nach Versuchsbeginn untersucht wurde, herausfällt. Der 120-Minuten-Wert bei 48 Stunden ist jedoch nach ebenfalls linearem Abfall des Verhältnisses A : C zwischen 15 und 60 Minuten wieder so groß wie bei 15-minütiger Ischämiedauer. Diese Befunde zeigen, daß bei kurzer Blutzufuhrsperre der Regenerationsreiz zuerst im behandelten Lappen eine größere Wirkung hat und daß die längerdauernde Ligatur entweder den unbehandelten Lappen C in größerem Maße stimuliert bzw. im Lappen A die Regenerationskraft relativ hemmt. Nach 48 Stunden kann das geschädigte Parenchym diesen

Rückstand aufholen, so daß das Verhältnis A : C den Wert > 1 erreicht. Ähnliche Befunde ergeben sich auch aus den autoradiographischen Untersuchungen(Abb. 6).

2. Autoradiographie

Auch die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen (Abb.3) weisen die bei der Untersuchung der Verbrennungsergebnisse erwähnte lineare Beziehung zwischen Ischämiedauer und Markierungsindex auf und beweisen eine deutliche Abhängigkeit des Ausmaßes der DNS-Synthese von der Ischämiedauer. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Radioaktivitätsmessungen ist der Aktivitätsanstieg bei zunehmender Ischämiedauer in den Versuchen mit 24-, 36- und 48-stündiger Versuchsdauer meist kontinuierlich, setzt also schon bei einer kurzen Ischämiedauer ein. Die proliferationsauslösende Mindestischämiedauer beträgt beim Versuch über 36 Stunden 15 Minuten, bei den 24- und 48-stündigen Versuchen liegt sie dagegen zwischen 15 und 30 Minuten.

Da es nicht gelingt, zum Untersuchungszeitpunkt 12 Stunden postoperativ durch Ischämie unterschiedlicher Dauer als Regenerationsreiz eine wesentliche Proliferation auszulösen (Abb.3a), haben die einzelnen Kurven, die den Markierungsindex in Abhängigkeit der Versuchsdauer zeigen (Abb.4 und 5) einen gemeinsamen Ausgangspunkt. Die DNS-Synthese ist demnach erst gegen 24 Stunden nach dem Eingriff möglich, nachdem die Zellen ihren Stoffwechsel auf die Proliferation umgestellt haben.

Der Markierungsindex der Hepatocyten ist 12 Stunden postoperativ (Abb.4 und 5) ähnlich niedrig wie in ruhendem Leberparenchym. Die Kurven erreichen mit steilem Anstieg über 24 Stunden bei der 36. Stunde postoperativ maximale DNS-Synthesewerte. Nach 48 Stunden ist die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation bereits wieder abgefallen. Diesen Verlauf weisen alle Kurven für 15, 30,

60 und 120 Minuten Ischämiedauer auf, wobei die stärkste Regenerationstätigkeit unabhängig von der Ischämiedauer um die 36. Stunde postoperativ erfolgt (Abb. 4 und 5).

Die Ergebnisse der Versuche A und B zeigen, daß eine Durchblutungssperre, die 67 % der Leber umfaßt, gegenüber der 1/3-Ischämie die Reizschwelle, die zur DNS-Synthese führt und den ^{3}H-Markierungsindex der Hepatocyten eklatant emporschnellen läßt, durchbricht.

Mit zunehmender Ischämiedauer wird die Verminderung des Quotienten A : C auf <1 und eine erneute Regenerationsüberlegenheit des Lappens A nach größerem postoperativem Intervall deutlich (Abb. 6), d.h. A : C wird >1. Zur weiteren Demonstration dieser Ergebnisse dient Abb. 3, wo im Teil b Lappen C stärker reagiert bzw. im Teil d sich Lappen A regenerationsfreudiger erweist, nachdem sich letzterer zu diesem späten Untersuchungszeitpunkt erholt hat. Der lineare Abfall des Verhältnisses A : C bei zunehmender Ischämiedauer ist durch den schneller ansteigenden Markierungsindex im nicht ligierten Lappen bei länger dauernder Anoxie zu erklären (Abb. 3). Nach 48 Stunden überwiegt jedoch wieder die Aktivität im Lappen A.

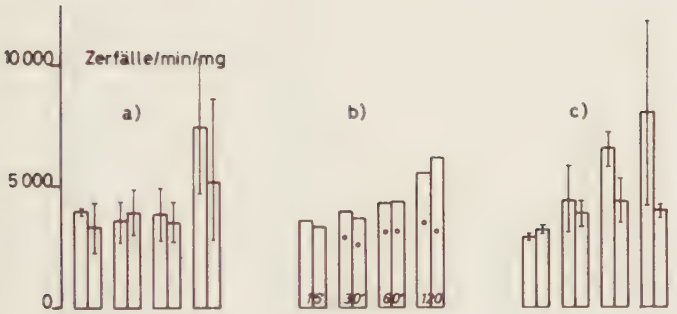


Abb. 1
Inkorporation von Thymidin-6-T (n) im Lebergewebe nach einer 33 % des Lebenparenchyms umfassenden Ischämie. Die Teilversuche a, b und c dauerten 14, 24 bzw. 36 Stunden. Der linke Teil eines Säulenpaares stellt die Aufnahme von Thymidin in den ligierten Lappen A, der rechte in den nicht ligierten Lappen C dar. Einige Kontrollwerte sind mit kleinen Kreisen angegeben.

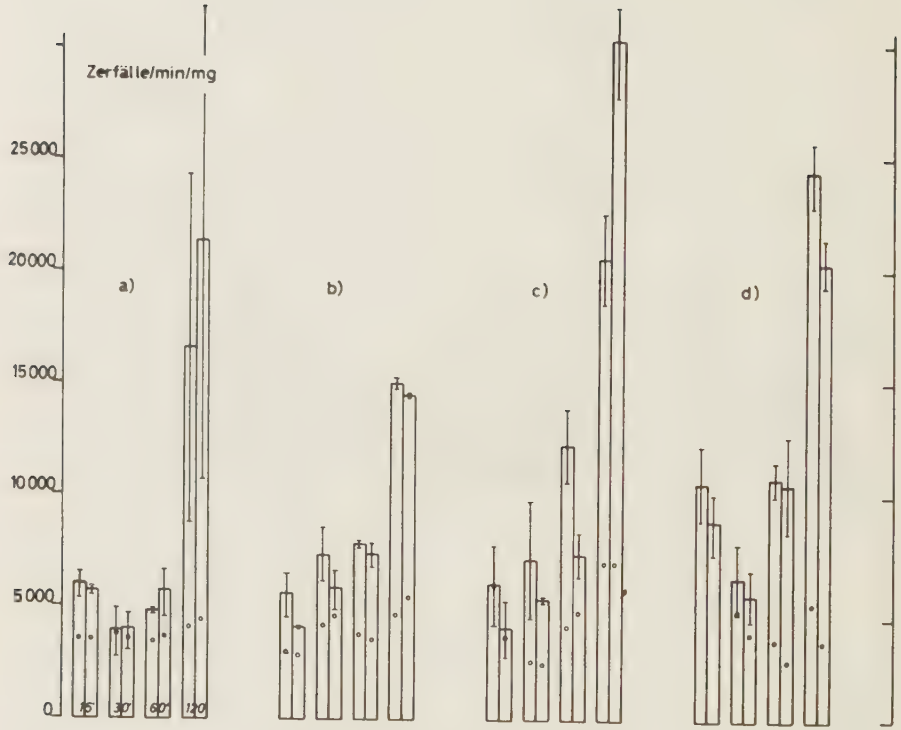


Abb. 2
Inkorporation von Thymidin-6-T (n) in regenerierendem Leberparenchym nach einer 67 % des Parenchyms umfassenden Ischämie. Die Versuchsdauer beträgt bei a bis d 12, 24, 36 bzw. 48 Stunden. Die linke Hälfte eines Säulenpaares stellt die Aufnahme von Thymidin in das ligierte Gewebe, die rechte Hälfte in den nicht ligierten Lappen dar. Die kleinen Kreise in den Säulen sind Kontrollwerte.

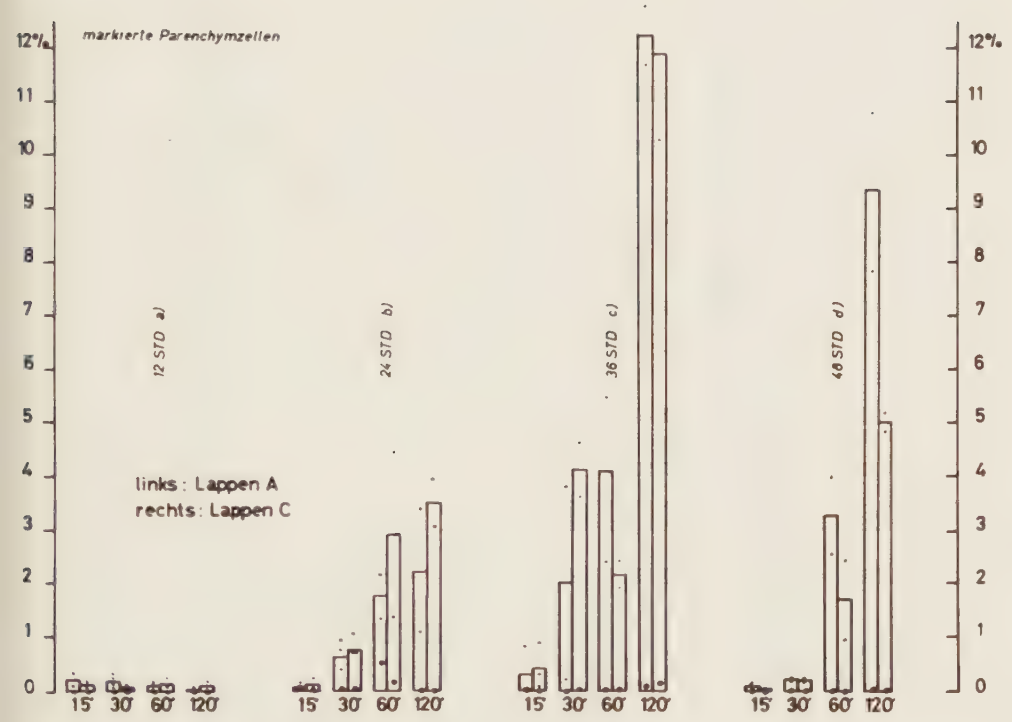


Abb. 3

^{3}H-Markierungsindex regenerierender Leber nach 2/3-Ischämie in Abhängigkeit von Ischämiedauer und vom Untersuchungszeitpunkt.

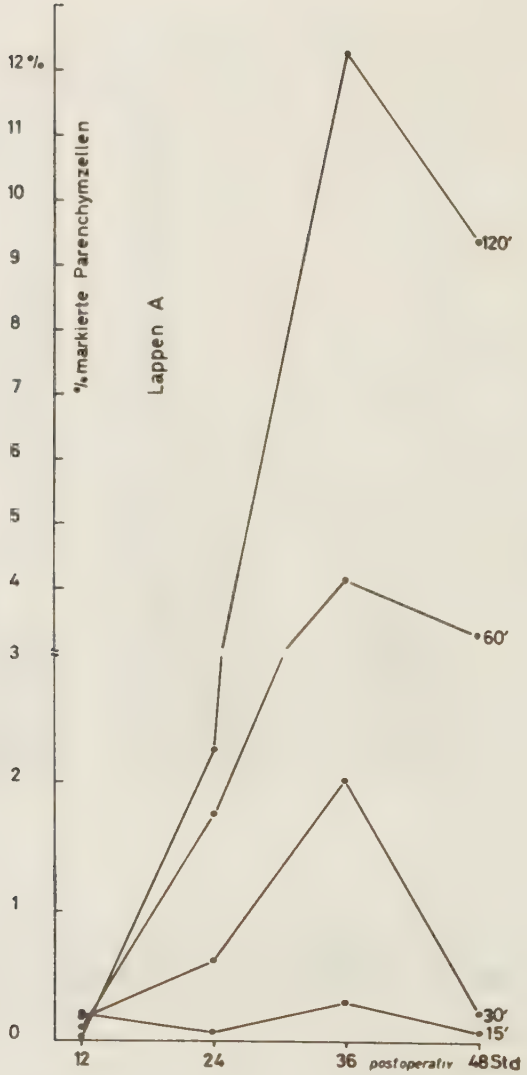


Abb. 4
^{3}H-Markierungsindex in ligiertem Lebergewebe nach 2/3-Ischämie in Abhängigkeit von Ischämiedauer und vom Untersuchungszeitpunkt.

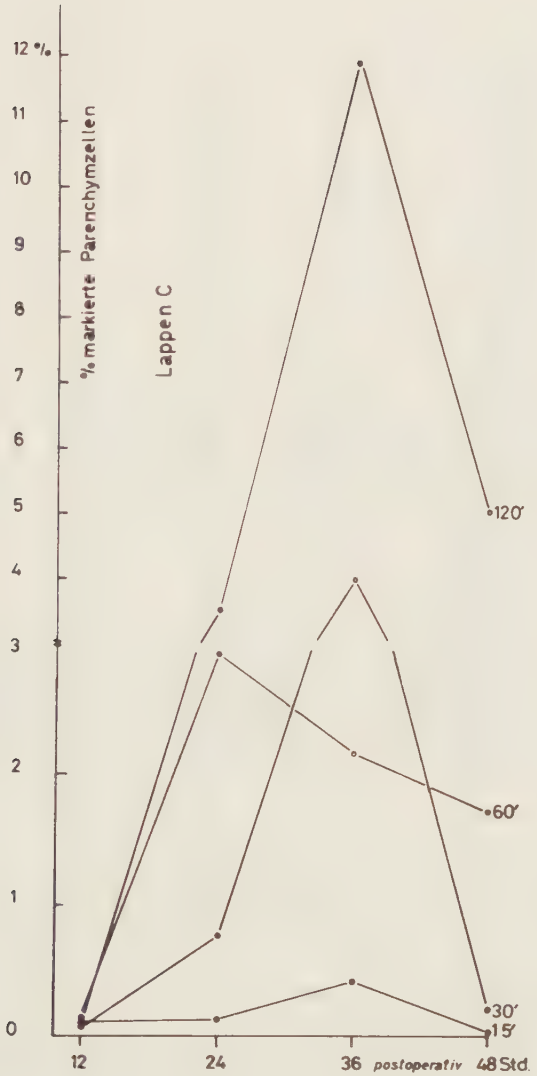


Abb. 5

^{3}H-Markierungsindex in nicht ligiertem Lebergewebe der regenerierenden Leber nach 2/3-Ischämie in Abhängigkeit von Ischämiedauer und vom Untersuchungszeitpunkt.

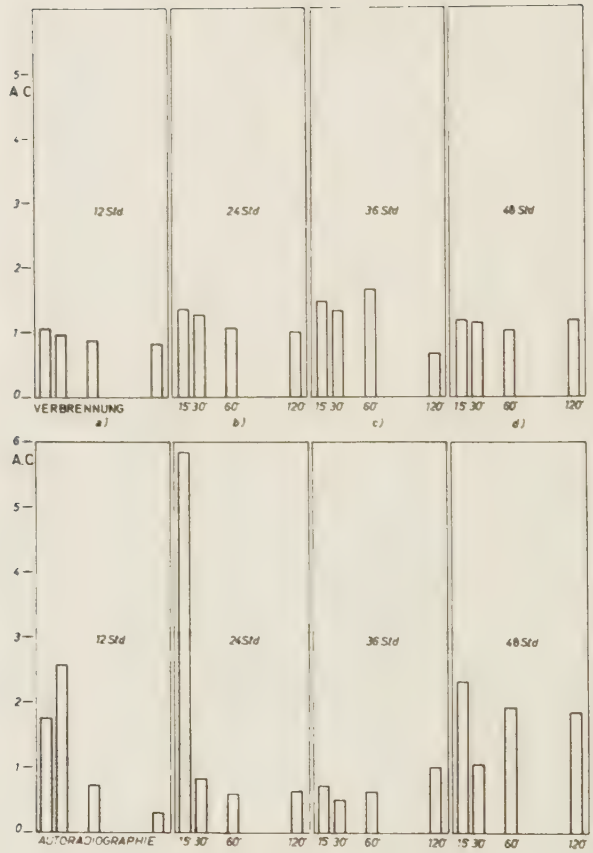


Abb. 6
Verhältnisse der Zerfallsraten (Verbrennung) bzw. der ^{3}H-Markierungsindizes (Autoradiographie) von ligiertem Lappen A zu nicht ligiertem Lappen C in Abhängigkeit von Ischämiedauer (15, 30, 60 und 120 Minuten) nach verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (12, 24, 36 bzw. 48 Stunden postoperativ).

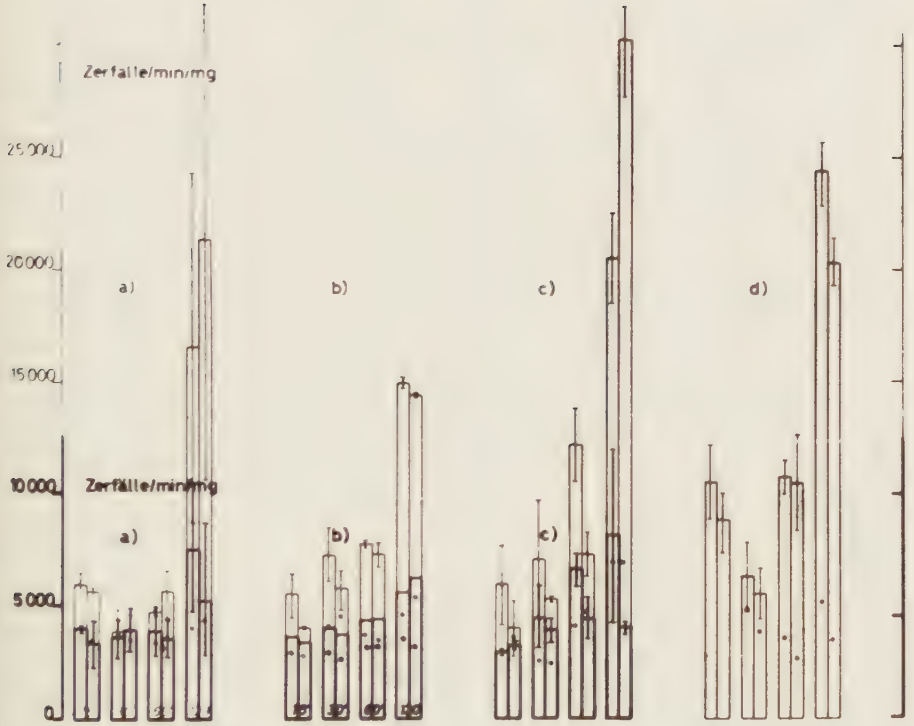


Abb.7
Projektion von Abb.1 auf Abb. 2: Vergleich von kaum regenerierender Leber nach 1/3-Ischämie (Versuch A) und regenerierender Leber nach 2/3-Ischämie (Versuch B).

Ischämie-dauer	Lappen	markierte Parenchymzellen in o/oo auf 10^4 Zellen (Tiere)		(Tiere)		(Tiere)	
15	A	0.10	(2)	0.33	(10)	1.60	(2)
	C	0.00	(2)	0.50	(10)	0.90	(2)
30	A	0.30	(2)	0.53	(10)	1.00	(2)
	C	0.40	(2)	0.45	(10)	0.25	(2)
60	A	0.30	(2)	0.60	(10)	7.80	(2)
	C	0.20	(2)	0.90	(10)	0.90	(2)
120	A	0.20	(2)	0.60	(5)	0.50	(2)
	C	1.50	(2)	3.02	(5)	2.80	(2)

Manifestationszeit: - 14 Stunden - - 24 Stunden - - 36 Stunden -

Tab. 1
^{3}H-Markierungsindex nach 1/3-Ischämie in Abhängigkeit von Ischämiedauer und vom Untersuchungszeitpunkt.

Zerfälle/mg/min. (x-fache Steigerung gegenüber den Kontrollwerten) Ischämie: 15'			30'		60'		120'		Manifestationszeit
A	2 539	(1.73)	22	(1.01)	1 336	(1.39)	12 470	(4.02)	
									12 Std.
C	2 097	(1.59)	418	(1.12)	1 949	(1.53)	16 872	(4.78)	
A	2 460	(1.80)	2 533	(1.54)	3 907	(2.02)	10 376	(3.22)	
									24 Std.
C	1 141	(1.40)	1 162	(1.25)	3 818	(2.09)	9 112	(2.70)	
A	37	(1.01)	4 503	(2.73)	8 040	(2.91)	11 647	(2.32)	
									36 Std.
C	374	(1.10)	2 770	(2.09)	2 561	(1.54)	23 242	(4.28)	
A			1 438	(1.30)	7 220	(3.03)	19 172	(4.70)	
									48 Std.
C			1 587	(1.42)	7 746	(3.84)	16 801	(5.75)	

Tab. 2
Ergebnisse der Flüssigkeitsszintillationsmessung in Durchschnittswerten.

Versuch C: Histochemische Untersuchungen nach einer 67 % des Leberparenchyms umfassenden Ischämie

Das Fehlen enzymhistochemischer Untersuchungen in den bisherigen Arbeiten, die der vorliegenden Versuchsanordnung entsprechen, war Anlaß, das Verhalten einer Reihe histochemisch nachweisbarer Enzyme in der Leber direkt nach experimentell erzeugter partieller Ischämie zu untersuchen.

In Ergänzung zur ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsmessung zu einem späteren postoperativen Zeitpunkt wurden die Enzymaktivitäten der Adenosintriphosphatase, Glukose-6-Phosphatase und der Succinodehydrogenase untersucht, um einige Hinweise über früheste Veränderungen in den Hepatocyten direkt nach dem Eingriff zu erlangen, die möglicherweise mit der nachfolgenden Proliferationsaktivität ursächlich im Zusammenhang stehen könnten.

Befunde:

1. Die Adenosintriphosphatase, die in normaler Rattenleber eine stärkere Aktivität in der Läppchenperipherie (Wachstein und Mitarbeiter 1962) aufweist, zeigt eine verminderte Reaktion im ligierten Lappen A gegenüber dem unbehandelten Restparenchym in Abhängigkeit von der Dauer der Durchblutungssperre.

a) Bei 15-minütiger Ischämiedauer ist kein Unterschied zwischen Lappen A und C zu sehen. Die Intensität der Enzymreaktion dürfte dem Normalzustand entsprechen. Die Gallenkapillaren sind netzartig über den gesamten Leberlobulus verteils dargestellt (Abb.8), wobei die Dichte des Reaktionsniederschlages in den lobulozentralen Abschnitten gegenüber der Peripherie niedriger ist.

b) Der Befund nach 30-minütiger Ligatur hat sich nur geringfügig geändert. Die Intermediärzone weist einen geringen Aktivitäts-

schwund im Lappen A auf. Die Enzymaktivität in den Gallengängen fehlt im zentralen Bereich der Läppchen oder ist lückenhaft geworden. Sie beschränkt sich zunehmend auf die acinoperipheren Zellen (Abb. 9, 10).

c) Nach 60-minütiger Versuchsdauer wird der Unterschied bei noch erhaltenem Verteilungsbild sehr deutlich. Im behandelten Gewebe sind im zentralen und intermediären Bereich kaum noch enzympositive Leberzellen nachweisbar. Dagegen sind der schwach positive Randsaum bzw. die Portalbezirke noch zu erkennen. Das Netzwerk der Gallenkapillar-Adenosintriphosphatase ist in beiden Gewebsproben vollkommen verlorengegangen (Abb. 11).

d) Nach 120-minütiger Anoxie ist ein nahezu völliger Enzymausfall im ligierten Lappen A zu erkennen. Eine Restaktivität ist streng auf das Periportalfeld und die Gefäßwände des Ischämiegewebes beschränkt (Abb. 12). Der Unterschied zum nicht ligierten Gewebe ist besonders deutlich geworden. Der nicht ligierte Lappen C zeigt im gesamten Leberlobulus eine hohe Enzymaktivität, die jedoch weniger im Bereich der Gallenkapillaren sondern diffus intrazellulär unter Aussparung der Zellkerne zu finden ist. Da die Kryostatschnitte vor dem Enzymnachweis nicht fixiert wurden, muß daran gedacht werden, daß die gesteigerte intraplasmatische Enzymaktivität von der mitochondrialen Adenosintrophosphatase herrührt.

Lappen A Lappen C

Abb. 8

Abb. 9

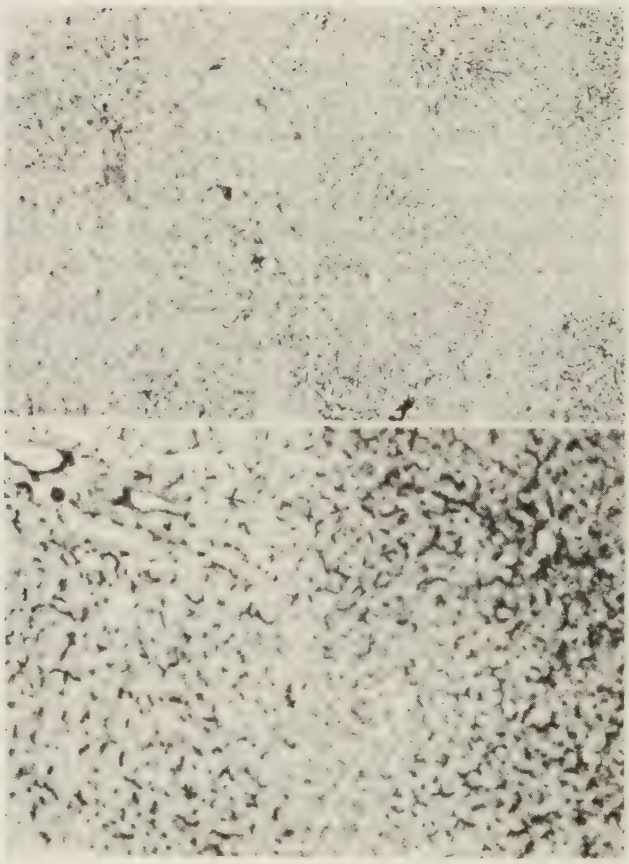


Abb. 8:
Darstellung der Adenosintriphosphatase im Leberparenchym nach 15 Minuten Ischämiedauer.

Abb. 9:
Darstellung der Adenosintriphosphatase im Leberparenchym nach 30 Minuten Ischämiedauer.

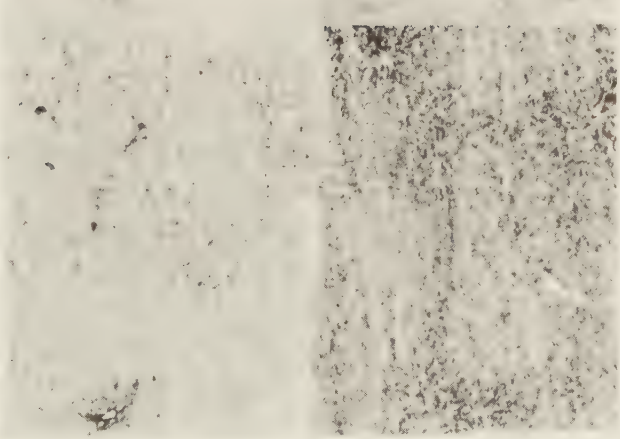
Vergrößerung: 40-fach Abb. 8 - 100-fach Abb. 9
Lappen A: ligiert - Lappen C: nicht ligiert

Lappen A Lappen C

Abb. 10:
Darstellung der Adenosintriphosphatase im Leberparenchym nach 30 Minuten Ischämiedauer.

Abb. 11:
Darstellung der Adenosintriphosphatase im Leberparenchym nach 60 Minuten-Ischämiedauer.

Abb. 12:
Darstellung der Adenosintriphosphatase im Leberparenchym nach 120 Minuten Ischämiedauer.



Vergrößerung: 40-fach

Lappen A: ligiert - Lappen C: nicht ligiert

2. Die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase ist in der normalen Leber auf das Zytoplasma (rauhes- und glattes endoplasmatisches Retikulum, De Duve und Mitarbeiter 1955, Tice und Barrnett 1962) und äußere Kernmembran (Tice und Barrnett 1962) der Hepatocyten beschränkt, und die Periportalregion reagiert stärker (Tice und Barrnett 1962, Gössner und Friedrich-Freksa 1964).

Bei geringer Parenchymschädigung durch Ischämie über 15 Minuten sind die Unterschiede im Verhalten der einzelnen Läppchenabschnitte nicht nachweisbar. Der Enzymausfall beginnt wie bei der Adenosintriphosphatase mit Verlängerung der Ischämiedauer um die Vena centralis, und das Reaktionsprodukt beschränkt sich zunehmend auf die Periportalgebiete. Während nach 15-minütiger Ischämie die Aktivität noch bei beiden Gewebsproben voll erhalten ist, werden die Kontraste der nebeneinandergelegten Präparate zwischen ligierten und nicht ligierten Leberproben mit zunehmender Ischämiedauer deutlich (Abb. 13 bis 16).

Lappen A Lappen C

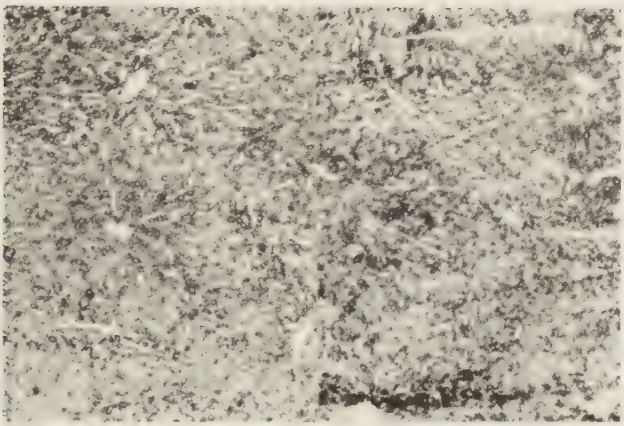


Abb. 13:
Nachweis der Glucose-6-Phosphatase im Leberparenchym nach 15 Minuten Ischämiedauer.

Vergrößerung: 40-fach
Lappen A: ligiert - Lappen C: nicht ligiert

Lappen A Lappen C

Abb. 14 30'

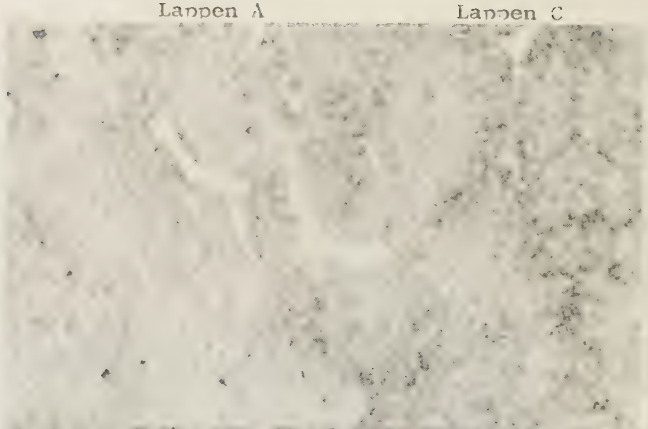


Abb. 15 60'

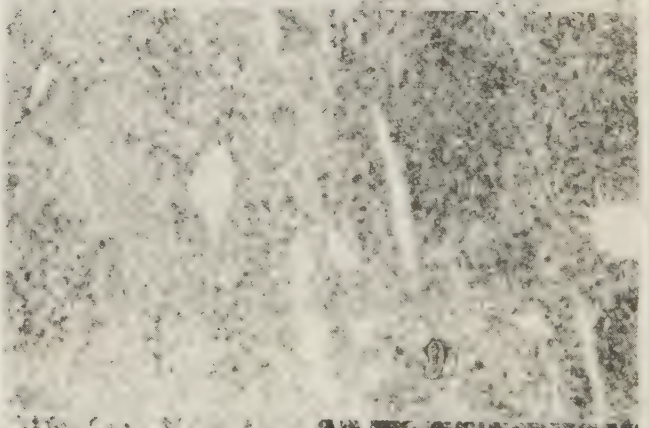
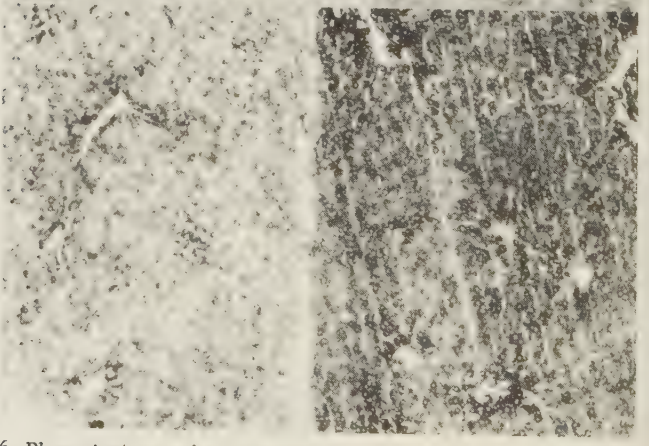


Abb.16 120'



Nachweis der Glucose-6-Phosphatase im Leberparenchym.
Die Ischämiedauer betrug 30, 60 und 120 Minuten.

Vergrößerung: 40-fach

Lappen A: ligiert - Lappen C: nicht ligiert

3. Succinodehydrogenase:

Die Succinodehydrogenase ist an den Cristae mitochondriales lokalisiert (Wachstein und Mitarbeiter 1962), und das Reaktionsprodukt lagert sich demzufolge bei der histochemischen Färbung im Zelleib ab. Die Enzymkonzentration ist in normaler Leber in der Läppchenperipherie am größten (Wachstein und Mitarbeiter 1962).

Nach der Ischämiedauer von 15 Minuten unterscheidet sich die Enzymfärbung in Intensität und Verteilung nicht vom Gewebe des nicht ligierten Leberteiles. Die Aktivität des Enzymes zeigt im weiteren Verlauf im Vergleich mit den anderen untersuchten Enzymen ein gegensätzliches Verhalten. Bei verlängerter Ischämiedauer manifestiert sich, vom Grad der Schädigung abhängig, eine zunehmende Aktivität im intermediären und zentralen Läppchenbereich. Das geschädigte und das nicht geschädigte Parenchym unterscheiden sich dadurch, daß diese Veränderung im ungeschädigten Gewebe in einem viel geringeren Maße zu beobachten ist. Die Aktivitätsdifferenz in den Lobuli des ligierten Lappens A ist zwischen Peripherie und Intermediärzone nach 60 und 120 Minuten Ischämie nur noch gering (Abb. 17 bis 20).

Lappen A Lappen C

Abb. 17

Abb. 18

Abb. 17:
Darstellung der Succinodehydrogenase im Leberparenchym nach 15 Minuten Ischämiedauer.

Abb. 18:
Darstellung der Succinodehydrogenase im Leberparenchym nach 30 Minuten Ischämiedauer.

Vergrößerung: 40-fach

Lappen A: ligiert - Lappen C: nicht ligiert

Lappen A Lappen C

Abb. 19

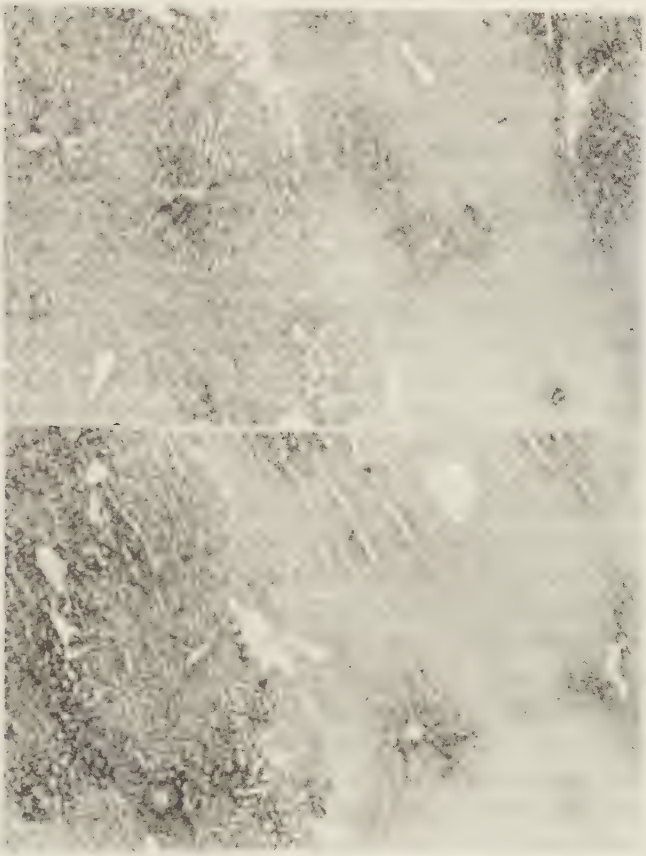


Abb. 20

Abb. 19:
Darstellung der Succinodehydrogenase im Leberparenchym nach 60 Minuten Ischämiedauer.

Abb. 20:
Darstellung der Succinodehydrogenase im Leberparenchym nach 120 Minuten Ischämiedauer.

Vergrößerung: 40-fach

Lappen A: ligiert - Lappen C: nicht ligiert

IV. Erörterungen

Die Untersuchungen haben bestätigt, daß eine zeitlich begrenzte Ligatur der Lebergefäße geeignet ist, in der Leber kompensatorisches Wachstum auszulösen. Im Gegensatz zur Teilhepatektomie, bei der das gesamte Pfortaderblut das restliche Leberparenchym durchströmt und dort eine portale Hypertension erzeugt, die sich erst nach 24 Stunden normalisiert hat (Alston und Thomson 1963), tritt bei der partiellen, temporären Leberischämie nur eine kurz andauernde Drucksteigerung in der Pfortader auf. Es kann deshalb angenommen werden, daß bei der hier angewandten Möglichkeit zur Setzung eines Regenerationsreizes unkontrollierbare, störende Einflüsse weitgehend ausscheiden.

Mehrere Autoren haben eine Teilischämie der Leber durch Ligatur eines Pfortaderastes erzeugt (Steiner und Martinez 1961, Lieberman und Short 1965, Lieberman und Mitarbeiter 1965 a). In der vorliegenden Arbeit wurden außer der Vena portae die Äste der Arteria hepatica und des Ductus hepaticus gleichzeitig temporär unterbunden. Die zusätzliche Unterbindung dieser beiden Gefäße dürfte jedoch ohne Bedeutung sein. So haben Lieberman und Mitarbeiter (1965 a) beschrieben, daß die Versorgung durch die Arteria hepatica für die Erhaltung der Leberzellfunktionen unwichtig ist. Da nach Steiner und Martinez (1961) die Blutversorgung des Leberparenchyms durch die Arteria hepatica besonders bei der Ratte untergeordnete Bedeutung hat, hat eine Ligatur der Arteria hepatica, die 2/3 der Äste erfaßt, keine oder nur geringe Veränderungen im Leberparenchym zur Folge (Steiner und Martinez 1961), zumal der Eingriff in unseren Versuchen von kurzer Dauer war.

Entsprechende Befunde an der Leber des Menschen erhoben Cohnhein und Litten (1876), Löffler (1927, 28, 29), Aunap (1931), Petersen (1935), Benninghoff (1942) und Kettler (1954).

Eine Ligatur des Ductus hepaticus an der Ratte ist erst nach einer Dauer von zwei Tagen von einer Gallengangsproliferation und erst nach sieben Tagen von Nekrosen im Parenchym der Leber gefolgt (Steiner und Martinez 1961). Es kann damit angenommen werden, daß die Veränderungen, die über die Einflüsse der Portaligatur hinausgehen, das Ergebnis erst später als zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchungen beeinflussen würden. Deshalb kann man die Befunde mit denjenigen anderer Autoren, die eine selektive Ligatur eines Pfortaderastes (beschrieben bei Steiner und Martinez 1961) vorgenommen haben, gut vergleichen.

Als Maß der Regenerationsaktivität wurde die DNS-Synthese gemessen, die für das schärfste Kriterium aller Wachstumsvorgänge gehalten wird (Rabes 1967). Da die Mitoseauslösung außerordentlich komplex verläuft, sollten stattdessen wohldefinierte biochemische Kriterien herangezogen werden (Siebert 1966). Die Thymidin-^{3}H-Autoradiographie ist der häufig angewandten Mitosezählung überlegen (Schultze und Oehlert 1960 , Rabes 1967). Beim Einbau radioaktiver Vorläufer in vivo wird ein Spektrum modifizierender Einflüsse beschrieben (Kelly und Mitarbeiter 1960, Bryant 1962, Quastler 1963). Artefakte sind bei der Autoradiographie nach Doniak und Pelc (1950) möglich. Dennoch darf die Gültigkeit der Autoradiographie mit ^{3}H-Thymidin zur Beurteilung der Regenerationsvorgänge als gesichert gelten (Burton 1955, Bianchi 1961, Chang und Looney 1965).

Es liegt auf der Hand, daß die Autoradiographie der Flüssigkeitsszintillationsmessung nach Gewebsveraschung zur Bestimmung der Einbaurate von radioaktiv markiertem Thymidin vorzuziehen ist, denn es wird der Prozentsatz der DNS-synthetisierenden Hepatocyten genau erfaßt. Trotzdem stimmen die Ergebnisse beider Methoden in vielen Punkten überein (vergl.Rabes 1967, Abb.33 und 42).

In zahlreichen Veröffentlichungen anderer Autoren wurde statt der Verbrennung des Gesamtgewebes und Beziehung der Aktivität auf mg Gewebstrockengewicht die spezifische Aktivität der DNS bestimmt. Dabei geht die Aktivität, die nicht in die DNS der Zelle inkorporiert ist, nicht mit in das Ergebnis ein. Sie hat bei der Messung der Radioaktivität des Gesamtgewebes nach Verbrennung sicher eine große Bedeutung. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß die Verfügbarkeit von ^{3}H-Thymidin nur etwa 40 Minuten beträgt (Hughes und Mitarbeiter 1958, Hughes 1959, Maurer und Koburg 1961). Die nicht in die DNS inkorporierte Substanz ist zum Teil bis zur Organentnahme abgebaut. Trotzdem ist ein größerer Teil der radioaktiven Abbauprodukte im Gewebe vorhanden. Diese Radioaktivität geht bei der Verbrennung mit in das Ergebnis ein.

Außer den Hepatocyten inkorporieren auch Mesenchymzellen ^{3}H-Thymidin. Diese Zellen können bei der Autoradiographie gesondert ausgezählt werden. Dagegen geht bei der ^{3}H-Aktivitätsmessung im Oxydationswasser nach Gewebsverbrennung die DNS-Synthese aller Zellpopulationen in das Ergebnis ein. Einige Autoren geben jedoch an, daß der Beginn der DNS-Synthese nach einer Teilhepatektomie in den Stromazellen später einsetzt: Die Kupffer'schen Sternzellen und Gallengangsepithelien beginnen die DNS-Synthese zwischen 24 und 32 Stunden postoperativ (Oehlert und Mitarbeiter 1962, Grisham 1962) und haben ihr Maximum von der 42-sten bis 50-sten Stunde (Grisham 1962, Fabrikant 1968). In den vorliegenden autoradiographischen Präparaten ist ebenfalls keine auffällig hohe Zahl markierter Mesenchymzellen zu finden. So ist es zu erklären, daß, wie auch bei Stöcker (1966) die Ergebnisse der Verbrennung den mit autoradiographischen Methoden gewonnenen Ergebnissen ähnlich sind und erste, semiquantitative Aussagen über die Proliferationsaktivität der Hepatocyten zulassen. Der Aussagewert der Flüssigkeitsszintillationsmessung wird zusätzlich durch Kurvenverläufe des ^{3}H-Indices in den Leberparenchymzellen nach

Teilresektion untermauert (Oehlert und Mitarbeiter 1962, Stöcker 1966, Rabes und Brändle 1969), die in der Kinetik völlig mit den Ergebnissen der ^{14}C- und ^{3}H-Thymidin-Aktivitätsmessung (Bucher und Mitarbeiter 1964, Bucher und Swaffield 1964, Rabes und Mitarbeiter 1965) übereinstimmen.

Die Tatsache, daß das ligierte und nicht ligierte Lebergewebe nach einer 120-minütigen Ischämie schon 12 Stunden postoperativ hohe Impulsraten aufweisen (Abb.2a), ist nicht geklärt. Mit Hilfe der autoradiographischen Methodik wurde eindeutig festgestellt, daß nach 12 Stunden Manifestationszeit unabhängig von der Ischämiedauer keine höhere DNS-Synthese in den Hepatocyten als bei Kontrolltieren stattfindet. Für beide Methoden wurden in den vorliegenden Versuchen Teile identischer Organe verwendet. Sollte nur das ligierte Gewebe einen Aktivitätsanstieg vorweisen, so könnte man vermuten, daß das geschädigte Gewebe angebotenes Thymidin in besonderem Maß in den Nekrosen zurückhält, ohne daß es zu einer Inkorporation in die DNS kommt. Da jedoch das nicht ligierte Gewebe vom entsprechenden Tier ebenfalls hohe, bzw. bei 1/3-Ischämie selbst das ligierte Gewebe keine überhöhte Aktivität zeigen (Abb.1 bzw. Abb. 2), ist diese Überlegung hinfällig. Zur Deutung dieser Befunde kann daher nur angenommen werden, daß der Anteil radioaktiver Abbauprodukte des Thymidins an der gemessenen Radioaktivität hoch ist.

Für die Niere besteht postischämisch (Pfob 1966) und für die Leber nach Teilresektion (Bucher und Glinos 1950, Bucher und Mitarbeiter 1964, Bucher und Swaffield 1964) eine Abhängigkeit der Proliferationskinetik vom Alter der Versuchstiere. Aus der Tabelle des Zentralinstituts für Versuchstierzucht Hannover-Linden läßt sich das Körpergewicht der von uns verwendeten Wistar-\F/Han-Ratten dem Lebensalter zuordnen. Bei den Versuchen wurden Tiere derselben Gewichtsklasse verwendet. Aus der Tabelle geht hervor, daß sie sechs bis sieben Wochen alt waren, also als "junge Erwachsene" zu gelten hatten. Sie zeigten dementsprechend gute Proliferationseigenschaften.

Trotz größter Sorgfalt ließen sich intra operationem leichte Verletzungen im Hilusbereich des Ligaturlappens nicht immer vermeiden. Die Gewebsproben wurden für die Auswertung hilusfern entnommen, denn Wundsetzungen oberflächlicher Art, zeigen nach 24 bis 48 Stunden eine Proliferationswelle, die jedoch auf das umliegende Parenchym lokal beschränkt ist (Cameron und Hassan 1957).

Zwar ist von Kelly und Mitarbeitern (1960) beschrieben worden, daß Infektionen den Einbau markierter Substanzen modifizieren können, doch Grundmann und Seidel (1969) berichten von einer allgemeinen Resistenz der Ratte gegen abdominelle Infekte, die eine Asepsis erübrige. Dessen ungeachtet wurde bei der Operation größtmögliche Sauberkeit durch Sterilisieren der Bestecke und Desinfektion der Haut eingehalten.

In der Literatur sind Angaben darüber zu finden, daß die Tagesperiodizität bei der Proliferation in tierischem Gewebe eine große Rolle spielt. Neuere Studien darüber sind zu finden bei Voutilainen (1953), Halberg und Mitarbeiter (1958), Jackson (1959), Peters (1962) und Aschoff (1963).

Große Differenzen traten bei der Mitosetätigkeit zwischen der vorübergehend ischämierten Niere und dem nicht geschädigten kontralateralen Organ auf. Die Phasenbilder der Proliferationskinetik der beiden Nieren verliefen nicht synchron, sondern waren gegeneinander stark verschoben in bezug auf die Tagesrhythmik (Blumfeld 1938, Pfob 1966). Bei unseren Untersuchungen wurde ein bestimmter Tötungszeitraum eingehalten, und die Operationszeitpunkte wurden entsprechend danach ausgerichtet, um den Einfluß von Tagesschwankungen auszuschalten.

Ischämie- und Resektionsversuche weisen einige Parallelen auf. Die Ergebnisse einer 67 %-igen Dauerischämie sollen von denjenigen einer 2/3-Resektion nicht (Lieberman und Short 1965,

Lieberman und Mitarbeiter 1965 b) oder nur quantitativ (Tsukada und Lieberman 1965, Siebert 1966) verschieden sein. Untersucht wurden Frühveränderungen und die DNS-Synthese.

Die Stärke der Proliferationsaktivität hängt jedoch vom Ausmaß der Schädigung ab (Altmann 1966). 2,3 bis 66,5 %-ige Resektionsversuche haben ergeben, daß der ^{3}H-Thymidineinbau in die Hepatocyten nach einem Parenchymverlust von mindestens 10 % beginnt und eine Resektion bis zu 40 % (Mac Donald und Mitarbeiter 1962) bzw. ein Parenchymverlust unter 67 % (Drabkin 1947) eine nur geringe Leberzellproliferation bewirkt. Islami und Mitarbeiter (1958), Straube und Patt (1961) und Bucher und Mitarbeiter (1964) berichteten von einer direkt proportionalen Beziehung zwischen Resektionsausmaß und Syntheserate nach Teilhepatektomie. Ähnliche Ergebnisse haben die Ischämieversuche gebracht: Eine Durchblutungssperre, die nur 33 % des Lebergewebes erfaßte, vermag nach 14, 24 und 36 Stunden so gut wie keine DNS-Synthese der Hepatocyten auszulösen. Die Ischämiedauer war dabei ohne Bedeutung. Erst durch eine Ligatur von 67 % des Parenchyms wurde die für die Auslösung erforderliche Schwelle des Proliferationsreizes überschritten.

Obwohl Lieberman und Short (1965) schon mit 0,5 bis 2-minütiger Ligatur Frühveränderungen und mit 10-minütiger Ischämie eine DNS-Bildung im Restorgan zwischen 18 und 40 Stunden postischämisch nachweisen, konnte in unseren Versuchen die 2/3-Ligatur über 15 Minuten zur 12., 24. und 48. Stunde nach dem Eingriff keine signifikante Proliferation auslösen. Nach einer 30-, 60- oder 120-minütigen Ischämie war der Anstieg der DNS-Synthese jedoch eklatant.

Für die Aktivierung und/oder Übermittlung einer Information, die eine DNS-Synthese induzieren soll, bedarf es also einer Ischämiemindestdauer von etwa 30 Minuten, wobei 67 % des Lebenparenchyms betroffen sein müssen.

Aus der Tatsache, daß für die Regenerationsauslösung eine Mindestmenge Parenchym über eine Mindestdauer aus dem Kreislauf ausgeschaltet werden muß, könnte man folgern, daß die von der Ischämie betroffenen Hepatocyten mit länger dauernder Ischämie zunehmend proliferationsspezifische Substrate entstehen lassen, die zunächst mit höherer Konzentration am Entstehungsort eine Wirkung entfalten und später auf humoralem Wege auch im übrigen Parenchym eine DNS-Synthese auslösen. Dies könnte der Grund dafür sein, daß der ligierte Lappen A gegenüber dem nicht ligierten Lappen C einen gewissen zeitlichen Vorsprung der DNS-Synthese nach kürzeren Eingriffen zeigt. Eine längere Anoxie dürfte die Fähigkeit zur spezifischen Substratbildung verringern, so daß die Zellen nach einem längeren Ischämieschaden nicht mehr zur Proliferation befähigt sind und der Quotient aus dem Markierungsindex Lappen A zu Lappen C (Abb. 6) <1 wird. Die Proliferation im Lappen C wird dann ähnlich wie unter Resektionsbedingungen induziert. Der durch 120-minütige Ischämie geschädigte Lappen A, bzw. die dort erhalten gebliebenen Parenchyminseln haben sich zum Untersuchungszeitpunkt 48 Stunden postischämisch wieder erholt und werden nun möglicherweise durch die Syntheseleistungen zur Regeneration, die auch im übrigen Gewebe im Gange sind, zusätzlich stimuliert, so daß das Verhältnis A : C wieder >1 wird (Abb. 6).

Wie nach 2/3-Resektion der DNS-Synthesebeginn zwischen der 12. und 18. Stunde (Grisham 1962) bzw. zwischen der 15. und 18. Stunde (Oehlert und Mitarbeiter 1962, Bucher und Mitarbeiter 1964, Edwards und Koch 1964, Lieberman und Short 1965, Stöcker 1966 und Fabrikant 1968 sowie Rabes und Brändle 1969) postoperativ erfolgt, so steigt auch nach 2/3-Ischämie der DNS-Markierungsindex erst nach 12 Stunden an (Abb. 4 und 5).

Das Synthesemaximum nach Teilresektion liegt bei der 23-sten bis 25-sten Stunde (Bucher und Mitarbeiter 1964, Grisham und Mitarbeiter 1966) bzw. zwischen der 22-sten und 28-sten Stunde (Grisham 1962

Bucher und Swaffield 1964, Edwards und Koch 1964, Rabes 1965, Stöcker 1966, Rabes und Brändle 1969). Bei den Ischämieversuchen liegt der Synthesegipfel etwa um die 36-ste Stunde nach dem Eingriff. Die Ischämiedauer hat auf den zeitlichen Verlauf der Proliferation keinen Einfluß, wie auch das Resektionsausmaß die Synthesezeitpunkte nicht beeinflußt (Mac Donald und Mitarbeiter 1962, Bucher und Mitarbeiter 1964).

Eine Untersuchung von Lieberman und Short (1965), nach der nach 10 Minuten Ischämiedauer zur 18-ten Stunde postischämisch der DNS-Gehalt gegenüber den Kontrollen um 422 %, zur 24-sten Stunde um 544 % und nach 40 Stunden um 555 % anstieg, widerspricht dem letzteren Befund nicht: Bei dieser Versuchsanordnung könnte das Synthesemaximum gegen 36 Stunden postoperativ liegen.

Entgegen anderen Ischämieversuchen an der Leber (z.B. Lieberman und Short 1965) wurde gezeigt, daß sowohl das ligierte als auch das nicht ligierte Parenchym auf den Regenerationsreiz ansprechen. Dadurch ist es möglich, den Ablauf der Proliferationskinetik beider Leberlappen zu vergleichen. Die oben erwähnte Phasendifferenz der Proliferationskinetik zwischen behandeltem und nicht behandeltem Gewebe nach einseitiger Nierenischämie (Blumenfeld 1938, Pfob 1966) in bezug auf die Tagesrhythmik konnte an der Leber nicht beobachtet werden. Die Kurvenverläufe des ^{3}H-Markierungsindices des ligierten Lappens A und des nicht ligierten Lappens C sind einander ähnlich. Der ^{3}H-Markierungsindex steigt jedoch im Lappen C zwischen der 12-ten und 24-sten Stunde bei den 30-, 60- und 120-Minuten-Werten schneller an und nimmt gegen die 48-ste Stunde früher ab als im Lappen A. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß im unbehandelten Lappen C das Proliferationsmaximum gegenüber dem anderen Lappen leicht vorverlegt ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß dieser Lappen unter ähnlichen Bedingungen wie das Restgewebe nach Teilresektion regeneriert, bei der der DNS-Synthesegipfel um Stunden früher erfolgt. Es handelt sich

vielleicht dabei um einen quantitativen, weniger um einen qualitativen Reizunterschied, nämlich um die zeitlich beschränkte bzw. lange andauernde Umleitung des gesamten Pfortadervenenblutes in das restliche Versorgungsgebiet von 33 % der Leber. Einige Autoren halten die hämodynamischen Verhältnisse wie Blutdruckanstieg, vermehrte Blutfülle oder erhöhten Blutdurchfluß für die spezifische Ursache der Regeneration (Lieberman und Short 1965). Auch Bollman und Mann (1936), Mann (1940) und Bucher (1963) messen der Druckerhöhung in der Vena portae eine Bedeutung zu. Außerdem glauben Naora und Naora (1957), Glinos (1958) und Lieberman und Mitarbeiter (1965 b), daß Injektionen isotoner Lösungen in die Vena portae die Blutkonzentrationen z.B. von Hemmstoffen herabsetzen und dadurch regenerationsauslösend wirken könnten. Nach solchen Injektionsversuchen konnten Lieberman und Mitarbeiter (1965 b) Veränderungen im RNS-Stoffwechsel nachweisen, die von denjenigen nach einer 2/3 Hepatektomie nicht zu unterscheiden sind (vergl. Lieberman und Short 1965, Tsukada und Lieberman 1965 und Siebert 1966). Nach Eingriffen in die Hämodynamik des Pfortadervenenblutes hat man auch andere Frühveränderungen untersucht, deren Wirkungsspezifität jedoch umstritten ist: Eine DNS-Synthese hat man auch ohne Einschränkung des Leberkreislaufes hervorrufen können (Bucher und Mitarbeiter 1950, Wrba und Mitarb. 1962, Short und Mitarb. 1969). Experimentell-chirurgische Methoden blieben ohne Proliferationseffekt: Erhöhte Pfortaderdurchblutung an der Hunde- und Hühnerleber ergab keine Umleitung des Pfortaderblutes mit Anschluß an die Aorta (Thomson und Clarke 1965) bzw. eine portocavale Transposition (Child und Mitarbeiter 1953) dagegen normale Regenerationsaktivität nach Teilhepatektomie am Hund (Mac Donald und Pechet 1961). Dagegen fand Mann und Magath (1922) keine Regeneration nach portocavalem Shunt. Eine Regeneration im Restgewebe nach 2/3-Resektion bei unterbrochenem Pfortaderzufluß hat Weinbren (1955) nachgewiesen. Sie spricht gegen eine spezifische Wirkung der Druckerhöhung,

und Fischer und Mitarb. (1954) haben nachgewiesen, daß eine Arterialisierung der Leber bzw. das Pfortaderblut an sich keine Wirkung auf die Proliferation haben.

Da sich nach vorübergehender Ligatur der um 35 % erhöhte Blutdruck schnell normalisiert hat (Lieberman und Short 1965) bzw. eine 15-minütige Ischämie entgegen den Befunden von Lieberman und Short (1965) nicht geeignet ist, eine Proliferation auszulösen, und da außerdem der ligierte Lappen A gleichzeitig mit dem nicht ligierten Lappen C die DNS-Synthese beginnt (nach Lieberman und Short reagiert Ischämiegewebe nicht), muß angenommen werden, daß den veränderten Durchströmungsverhältnissen keine entscheidende Bedeutung zukommt.

Zum Zeitpunkt des DNS-Synthesemaximums nach partieller Hepatektomie erreichte der Thymidin-^{3}H-Markierungsindex bei über zwei Jahre alten Ratten und jeweils einstündiger radioaktiver Versuchszeit einen Wert von etwa 15 %, jedoch etwa 30 % bei jüngeren Ratten (Stöcker 1966). In den eigenen Versuchen zeigte sich nach 2/3-Ischämie ein Maximum von etwa 12 % markierter Zellen und damit eine weit geringere maximale DNS-Syntheseaktivität, als bei der zum vollständigen Funktionsverlust eines Leberteiles führenden Teilresektion.

Bei einer Durchblutungshemmung in der Leber kommt es an den Mitochondrien zu einer Schwellung und zu einem Verlust der Cristae, am endoplasmatischen Reticulum zu Zysternen- und Bläschenbildung. Diese morphologisch faßbaren Veränderungen und auch diejenigen der Enzymaktivitäten nehmen mit der Länge der Ischämiedauer zu (Hübner 1961, Hübner und Bernhard 1961).

Da die Reaktionsabläufe im Zytoplasma in vielen Fällen auf die Intaktheit der zytoplasmatischen Strukturen angewiesen sind, und die Glukose-6-Phosphatase vorwiegend am endoplasmatischen Retikulum, die Adenosintriphosphatase an den Mitochondrien lokalisiert ist, wird es verständlich, daß die Enzymaktivitäten dieser

gleichsinnig mit der Schädigung dieser Strukturen vermindert werden. Die Aktivität der Succinodehydrogenase, die in den Mitochondrien lokalisiert ist, ist jedoch bei geschwollenen Mitochondrien erhöht (Raaflaub 1953, Scarpelli and Pearse 1958). Ein Aktivitätsanstieg der Succinodehydrogenase konnte auch in den vorliegenden Versuchen nach Schädigung der Zellen nachgewiesen werden. Dieser Aktivitätsanstieg ist möglicherweise ein Indikator für eine verstärkte Krebs-Zyklus-Aktivität und könnte auf eine vermehrte Syntheseleistung hindeuten.

Ischämieperioden von 30 Minuten Dauer sind hinreichend, sowohl die Enzymaktivitäten der hier untersuchten Enzyme sogleich zu beeinflussen, als auch eine DNS-Synthese, ähnlich der nach Teilresektion zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt hervorzurufen. Daß Veränderungen der Enzymaktivität mit dem Befund einer gesteigerten DNS-Synthese in ursächlich zeitlichem Zusammenhang stehen, kann nach den bisher vorliegenden Befunden noch nicht ausreichend belegt werden.

Die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Veränderungen an Mitochondrien und am endoplasmatischen Retikulum sind nach einer 5- oder 10-minütigen Ischämie bereits vorhanden; sie bilden sich jedoch in kürzester Zeit wieder zurück (Hübner und Bernhard 1961). Da kurzfristige Eingriffe (15 Minuten) abgesehen von den Ergebnissen von Lieberman und Short (1965) keine DNS-Synthese auslösen und die Aktivität der untersuchten Enzyme sich nicht verändern, kann angenommen werden, daß diesen primär erzeugten Veränderungen keine proliferationsspezifische Bedeutung zukommt. Eine proliferationsspezifische Wirkung ist erst nach genügend langer Einwirkung der vorausgehenden Schädigung möglich.

Falls die zunächst noch unspezifischen enzymhistochemisch und elektronenmikroskopisch faßbaren Befunde im ligierten Lappen proliferationsspezifische Veränderungen zur Folge haben, könnte eine Freisetzung von proliferationsfördernden Stoffen und/oder

die Reprimierung von Hemmstoffen vorwiegend im geschädigten Gewebe vor sich gehen: Da ausschließlich dort die primären Veränderungen lokalisiert sind, und da der Proliferationserfolg vom Ausmaß der Gewebsschädigung in proportionaler Abhängigkeit steht, könnte der Proliferationsstimulus auf das nicht ligierte Gewebe auf humoralem Wege übertragen werden.

V. Zusammenfassung

An der Rattenleber wurde durch partielle Hilusligatur eine zeitlich begrenzte Teilischämie durchgeführt, um Voraussetzungen für die Induktion einer DNS-Synthese im Leberparenchym zu schaffen.

Es wurden insgesamt 152 männliche Albinoratten operiert. An 51 Ratten wurde eine Ligatur von 33 % des Leberparenchyms von 15, 30, 60 bzw. 120 Minuten Dauer durchgeführt. 14, 24, 36 bzw. 48 Stunden nach dem Eingriff erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von Thymidin-6-H^3 und wurden 60 Minuten danach getötet. Bei 37 Ratten umfaßte die 15-, 30-, 60- oder 120-minütige Ischämie 67 % des Leberparenchyms. Diese Tiere wurden 12, 24, 36 bzw. 48 Stunden postoperativ mit ^3H-Thymidin injiziert und 60 Minuten danach getötet. 52 Tiere wurden als Kontrollen probelaparotomiert. Die inkorporierte Radioaktivität des Lebergewebes wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Im Autoradiogramm wurde der Thymidin-H^3-Markierungsindex der Hepatocyten gemessen. Bei weiteren 8 Tieren wurde nach 15- bis 120-minütiger Teilischämie in dem ligierten und nicht ligierten Leberlappen die Enzymaktivität der Adenosintriphosphatase, Glucose-6-Phosphatase und der Succinodehydrogenase untersucht.

Die Untersuchungen haben bestätigt, daß eine zeitlich begrenzte Ligatur der Lebergefäße geeignet ist, in der Leber kompensatorisches Wachstum auszulösen. Die DNS-Synthese nach Teilischämie erfolgt jedoch entgegen den Befunden anderer Autoren auch im ligierten Leberteil. Die gleichzeitigen Untersuchungen von ligiertem und nicht ligiertem Leberparenchym an Teilen identischer Organe ließen erkennen, daß der Beginn und das Maximum der DNS-Synthese in beiden Organteilen nahezu gleichzeitig erfolgen.

Eine 33 % des Leberparenchyms umfassende Ligatur kann keine erkennbare Steigerung der Proliferationsaktivität auslösen. Eine temporäre Ligatur von 67 % der Leber hat dagegen in Abhängigkeit von der Ischämiedauer eine signifikante Steigerung der DNS-Synthese zur Folge.

Bei diesen Ratten induziert jedoch eine Ischämiedauer von 15 Minuten noch keine eindeutig erhöhte Proliferationsaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 12 und 48 Stunden post operationem. Eine signifikant gesteigerte Proliferationsaktivität findet sich erst nach einer Ischämiedauer von 30 Minuten. Die Zahl der DNS-synthetisierenden Hepatocyten nimmt mit Verlängerung der Ischämiedauer zu.

In unseren Versuchsanordnungen erfolgte der DNS-Synthesebeginn zwischen der 12. und 24. Stunde post operationem. Der DNS-Synthesebeginn und der Zeitpunkt des Synthesemaximums werden durch Variation der Ischämiedauer (30, 60 oder 120 Minuten) nicht beeinflußt. Stark geschädigtes Gewebe proliferiert gegenüber nicht geschädigtem Gewebe verzögert. Zu einem späteren Zeitpunkt wird dieser Rückstand in den intakt gebliebenen Leberabschnitten der geschädigten Leberlappen aufgeholt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß veränderten Durchströmungsverhältnissen nach Teilischämie in der Rattenleber keine entscheidende proliferationsauslösende Bedeutung zukommt. Es ergeben sich Hinweise dafür, daß proliferationsspezifische Faktoren bei Ischämieversuchen im geschädigten Gewebe entstehen und das übrige Organ auf humoralem Wege beeinflussen.

Herrn Professor Dr. med. Hartmut RABES danke ich für die mir gestellte Aufgabe und für die wertvollen Hinweise bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Literaturverzeichnis

Alston, W. C. and R. Y. Thomson: Humoral and local factors in liver regeneration.
Canc. Res. 23, 901 - 905 (1963)

Altmann, H. W.: Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 15 - 53 (1966)

Aschoff, J.: Gesetzmäßigkeit der biologischen Tagesperiodik.
Dtsch. Med. Wschr. 88, 1930 - 1937 (1963)

Aunap, E.: Über den Verlauf der Arteria hepatica in der Leber.
Ztschr. f. mikr. anat. Forsch. 25, 238 - 251 (1931)

Benninghoff, A.: Lehrbuch der Anatomie des Menschen.
Bd. 1, 2. Aufl., München - Berlin: J. F. Lehmanns Verlag (1942)

Baillie, L. A.: Determination of liquid scintillation counting efficiency by pulse height shift.
Int. J. appl. Rad. Isot. 8, 1 - 7 (1960)

Bianchi, P. A., J. A. V. Butler, A. R. Chraton and K. V. Shooter: The thymidine-phosphorylating kinases.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 48, 213 - 214 (1961)

Bizzozero, G.: An address on the growth and regeneration of the organism.
Brit. med. J. 1, 728 - 732 (1894)

Blumenfeld, M. D.: Periodic and rhythmic mitotic activity in the kidney of the albino rat.
Anat. Rec. 72, 435 - 443 (1938)

Bollman, J. L. and F. C. Mann: The physiology of the impaired liver.
Erg. Physiol. Pharmakol. 38, 445 - 492 (1936)

Bray, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal. Chem. 1, 279 - 285 (1960)

Bryant, B. J.: Reutilization of leucocyte DNA by cells of regenerating liver.
Exp. Cell. Res. 27, 70 - 79 (1962)

Bucher, N. L. R.: Regeneration of mammalian liver.
Int. Rev. Cytol. 15, 245 - 300 (1963)

Bucher, N. L. R. and A. D. Glinos: The effect of age on regenerating rat liver.
Canc. Res. 10, 324 - 332 (1950)

Bucher, N. L. R., J. F. Scott and J. C. Aub: Regeneration of the liver in parabiotic rats.
Canc. Res. 10, 207 (1950)

Bucher, N. L. R. and M. N. Swaffield: The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating liver in relation of the amount of liver excised.
Canc. Res. 24, 1611 - 1625 (1964)

Burton, H.: Relation between synthesis of deoxyribonucleic acid and synthesis of protein in multiplication of bacteriophage T 2.
Biochem. J. 61, 473 - 483 (1955)

Cameron, G. R. and C. L. Cackley: Ligation of the common bile duct.
J. Path. Bact. 35B, 769 - 798 (1932)

Cameron, G. R., S. M. Hassan and S. N. De: Repair of Glisson's capsule after tangential wounds of the liver.
J. Path. Bact. 73, 1 - 10 (1957)

Chang, L. O. and J. B. Looney: A biochemical and autoradiographic study of the in vivo utilization of tritiated thymidine in regenerating rat liver.
Canc. Res. 25, 1817 - 1822 (1965)

Child, C. G. III, D. Barr, G. R. Holswade and S. C. Harrison: Liver regeneration following portocaval transposition in dogs.
Am. Surg. 138, 600 - 608 (1953)

Cohnheim, J. and M. Litten: Über Circulationsstörungen in der Leber.
Virchows Arch. Path. Anat. 67, 153 - 165 (1876)

De Duve, C., B. C. Pressman and R. Gianetto: Tissue fractionation studies; intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.
Biochem. J. 60, 604 - 617 (1955)

Doniak, J. and S. R. Pelc: Autoradiographic technique.
Brit. J. Radiol. 23, 184 - 192 (1950)

Drabkin, D. L.: Liver regeneration and cytochrome c metabolism; influence of amount of tissue excised and of diet, with a note on accompanying changes in liver nucleic acids.
J. Biol. Chem. 171, 359 - 408 (1947)

Edwards, J. L. and A. Koch: Parenchymal and littoral cell proliferation during liver regeneration.
Lab. Invest. 13, 32 - 43 (1964)

Fabrikant, J. I.: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver.
J. Cell. Biol. 36, 551 - 565 (1968)

Fischer, B., C. Russ, H. Updegraff and E. R. Fischer: Effect of increased hepatic blood flow upon liver regeneration.
A. M. A. Arch. Surg. 69, 263 - 272 (1954)

Gössner, W., H. Friedrich-Freksa: Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.
Z. Naturforsch. 19, 862 - 863 (1964)

Glinos, A. D.: The mechanism of liver growth and regeneration.
In Mc Elroy, W. D. and B. Glass, Edit.:
A symposium on the chemical basis of development. John Hopkins Press, Baltimore 1958

Griffith, J. Q. Jr. and E. J. Farris: The rat in laboratory ingestigation.
Lippincott, Philadelphia 1942, Pp. 488

Grisham, J. W.: A morphologic study of DNA-synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine H^3.
Canc. Res. 22, 842 - 849 (1962)

Grisham, J. W., G. F. Leong, M. L. Albright and J. D. Emerson: Effect of exchange transfusion on labeling of nuclei with thymidine-^3H and on mitosis in hepatocytes of normal and regenerating rat liver.
Canc. Res. 26, 1476 - 1485 (1966)

Grundmann, E. und H. J. Seidel: Die reparative Parenchymregeneration am Beispiel der Leber nach Teilhepatektomie.
In: Handb. d. allg. Pathol. Bd. 6, II., S. 129 - 245 (1969)

Halberg, F. J., J. Bittner und D. Smith: Belichtungswechsel und 24-Stunden-Periodik von Mitosen im Hautepithel der Maus.
Z. F. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch. 9, 69 - 73 (1958)

Higgins, G. M. and R. M. Anderson: Experimental pathology of the liver. I. Resection of the liver of the white rat following partial surgical removal.
A.M.A. Arch. Path. 12, 186 - 202 (1931)

Hübner, G. und W. Bernhard: Das submikroskopische Bild der Leberzelle nach temporärer Durchblutungssperre.
Beitr. Path. Anat. 125, 1 - 30 (1961)

Hughes, W. L.: The metabolic stability of deoxyribonucleic acid.
In Stahlman "The kinetics of cellular proliferation"
Grune & Stratton, New York - London (1969)

Hughes, J. L., V. P. Bond and G. Brecher: Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with ^{3}H-thymidine.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 476 - 483 (1958)

Islami, A. H., G. T. Pack and J. C. Hubbard: Regenerative hyperplasia of the cirrhotic liver following partial hepatectomy.
Cancer 11, 663 - 686 (1958)

Jackson, B.: Time-associated variations of mitotic activity in livers of young rats.
Anat. Rec. 134, 365 - 377 (1959)

Kalberer, F. und J. Rutschmann: Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem Probematerial mittels des Flüssigkeits-Szintillations-Zählers.
Helv. Chinica Acta, 44, 56 - 66 (1961)

Kelly, L. S., E. L. Dobson, C. R. Finney and J. D. Hirsch: Proliferation of the reticuloendothelial system in the liver.
Amer. J. Physiol.198, 1134 - 1138 (1960)

Kettler, L. H.: Parenchymschädigungen der Leber.
Ergebn. allg. Path. Anat. 37, 1 - 206 (1954)

Lieberman, I., J. L. Gingold, P. Kane and J. Short: Inorganic phosphate and Na^{+} increases in liver after partial hepatectomy.
Amer. J. Physiol.208, 903 - 907 (1965 a)

Lieberman, I., P. Kane and J. Short: The portal vein and the control of liver ribunucleic acid metabolism.
J. Biol. Chem. 240, 3140 - 3144 (1965 b)

Lieberman, I. and J. Short: Hepatic blood supply and control of deoxyribonucleic acid synthesis in liver.
Amer. J. Physiol. 208, 896 - 902 (1965)

Löffler, L.: Leberstudien: Die Zeichnung der Leberschnittfläche.
Virchows Arch. f. path. Anat. 272, 17 - 30 (1929)

Mac Donald, R. A. and G. Pechet: Liver cell regeneration due to biliary obstruction. Autoradiographic-bacteriologic and histologic studies.
Arch. Path. 72, 133 - 141 (1961)

Mac Donald, R. A., A. E. Rogers and G. Pechet: Regeneration of liver: Relation of regenerative response to size of partial hepatectomy.
Lab. Invest. 11, 544 - 548 (1962)

Mann, F. C. and T. B. Magath: The production of chronic liver insufficiency.
Amer. J. Physiol. 59, 485 (1922)

Mann, F. C.: The portal circulation and restoration of the liver after partial removal.
Surgery 8, 225 - 238 (1940)

Maurer, W. und E. Koburg: Autoradiographische Untersuchungen mit H-3-Thymidin über den zeitlichen Verlauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darmes und bei anderen Zellarten der Maus.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 45, 108 - 112 (1961)

Naora, H. and H. Naora: Synthesis of deoxypentose nucleic acid in liver cell of rat following plasmophoresis.
Gann 48, 255 - 261 (1967)

Oehlert, W., W. Hämmerling und F. Büchner: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNS-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Beitr. path. Anat. 126, 91 - 112 (1962)

Peters, R.: Die Mitosehäufigkeit in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Tageszeit, dem Gewicht der Tiere und der Ernährung.
Naturforsch. 17 b, 164 - 168 (1962)

Petersen, H.: Histologie und mikroskopische Anatomie. Organe der Reizbearbeitung.
Bergmann, München 1935, S. 673 - 947

Pfob, H.: Mitosehäufigkeit in der postischämischen regenerierenden Rattenniere in Abhängigkeit von der Tageszeit und vom Alter der Tiere.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 144 - 149 (1966)

Quastler, H.: Zit. nach Lajtha, D. G.: The use of radiation in studies of cell proliferation.
In: Lamerton, L. F. and R. J. M. Fry:
Edit.: Cell proliferation, p. 84, Blackwell, Oxford 1963

Raaflaub, J.: Die Schwellung isolierter Leberzellmitochondrien und ihre physikalisch-chemische Beeinflußbarkeit.
Helvet. physiol. et pharmacol. acta 11, 142 - 156 (1953)

Rabes, H.: Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum.
Veröffentlichung aus der morphologischen Pathologie, 73, 1 - 125 (1967)

Rabes, H. and H. Brändle: Synthesis of RNA, protein and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy.
Canc. Res. 29, 817 - 822 (1969)

Rabes, H., K. Urba, M. Eder und H. Brändle: DNS-Synthese und Cytoplasmaveränderungen bei der Leberregeneration nach Hypophysektomie.
Z. Naturforsch. 20 b, 607 - 608 (1965)

Rosa, C. G. and K. C. Tsou: Use of tetrazolium compounds in oxydative enzyme- histo- and cytochemistry.
Nature (London) 192, 990 - 991 (1961)

Rous, P. and L. D. Larimore: Relation of the portal blood to liver maintenance.
J. Exper. Med. 31, 609 - 631 (1920)

Scarpelli, D. G. and Pearse, A. G. E: Physical and chemical protection of cell constituents and the precise localization of enzymes.
J.Histochem. Cytochem. 6, 369 - 376 (1958)

Schultze, B. and W. Oehlert: Autoradiographic investigation of incorporation of ^{3}H-thymidine into cells of the rat and mouse.
Science 131, 737 - 738 (1960)

Schöninger, W.: Eine mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogen in organischen Substanzen.
Mikrochim. Acta 55, 123 - 129 (1955)

Short, J., R. Zemel, J. Kanta and I. Lieberman: Stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver parenchymal cells of the intact rat. Nature, 223, 956 - 957 (1969)

Siebert, G.: Steuerung und Energetik der Zellregeneration in biochemischer Sicht. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 119 - 132 (1966)

Steiner, P. E., J. B. Martinez: Effects on the rat liver of bile duct, portal vein and hepatic artery ligation. Am. J. Pathol. 39, 257 - 289 (1961)

Stöcker, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 53 - 74 (1966)

Stöcker, E., E. Teubner und G. Rosenbusch: Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. Verh. Dtsch. Ges. Path. 48, 295 - 299 (1964)

Straube, R. L. and H. M. Patt: Regeneration following partial hepatectomy as a function of age in the mouse. Fed. Proc. 20, 286 (1961)

Tice, L. W., R. J. Barnett: The fine structural localisation of glucose-6-phosphatase in rat liver. J. Histochem. Cytochem. 10, 754 - 762 (1962)

Thomson, R. Y. and A. M. Clarke: Role of portal blood supply in liver regeneration. Nature (London) 208, 392 - 393 (1965)

Tsukada, K. and I. Lieberman: Metabolism of nucleolar ribonucleic acid after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 239, 1564 - 1568 (1964 a)

Tsukada, K. and I. Lieberman: Synthesis of ribonucleic acid by liver nuclear and nucleolar preparations after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 239, 2952 - 2956 (1964 b)

Tsukada, K. and I. Lieberman: Liver nuclear ribonucleic acid polymerase formed after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 240, 1731 - 1736 (1965)

Voutilainen, A.: Über die 24-Stunden-Rhythmik der Mitosefrequenz in malignen Tumoren.
Acta path. microbiol. Scand. (Suppl. 99), pp 1-104 (1953)

Wachstein, M., M. Brandshaw and J. M. Ortiz: Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase activity in tissue sections.
J. Histochem. Cytochem. 10, 65 - 74 (1962)

Wachstein, M. and E. Meisel: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH.
Am. J. Path. 27, 12 - 23 (1957)

Weinbren, K.: The portal blood supply and regeneration of the rat liver.
Brit. J. Exper. Path. 36, 583 - 591 (1955)

Wrba, H., H. Rabes und W. Zintl: Zur Persistenz humoral induzierter Wachstumsvorgänge im Explantat.
Naturwissenschaften 49, 234 - 235 (1962).

Lebenslauf

Als Sohn des Dr. med. vet. Rudolf Grözinger, Oberregierungsveterinärrat und seiner Frau Johanna, geb. Floruß, wurde ich, Rolf-Dieter Grözinger am 19.1.1944 in Stuttgart - Bad Cannstatt geboren.
In Heilbronn besuchte ich bis 1956 die Grundschule und legte am Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn im Jahre 1965 die Reifeprüfung ab. Nach dem Sommersemester 1965 wechselte ich von der tiermedizinischen Fakultät zur humanmedizinischen Fakultät der Universität München über.
Das medizinische Staatsexamen habe ich am 23.6.1971 an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Erfolg abgelegt.